



Caractérisation du site de transport de l'échangeur anionique SLC4A1

Damien Barneaud-Rocca

► To cite this version:

Damien Barneaud-Rocca. Caractérisation du site de transport de l'échangeur anionique SLC4A1. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4119 . tel-00926767

HAL Id: tel-00926767

<https://theses.hal.science/tel-00926767>

Submitted on 10 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Nice Sophia Antipolis

Ecole doctorale 85

Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en biologie

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

par

Damien BARNEAUD-ROCCA

Caractérisation du site de transport de l'échangeur anionique SLC4A1

Le 13 décembre 2013

Composition du jury :

Prof. Robert Marsault	UNS - Nice	Président du jury
Dr. Isabelle Mouro-Chanteloup	INTS – Paris	Rapporteur
Dr. Michel Vivaudou	IBS – Grenoble	Rapporteur
Dr. Hélène Guizouarn	iBV, UNS - Nice	Directeur de thèse

Table des matières

1	Introduction : les transporteurs de bicarbonate.....	- 10 -
1.1	La famille des SLC4.....	- 10 -
1.1.1	Echangeurs anioniques électroneutres indépendants du sodium.....	- 11 -
1.1.1.1	SLC4A1.....	- 11 -
1.1.1.2	SLC4A2.....	- 37 -
1.1.1.3	SLC4A3.....	- 39 -
1.1.2	Transporteurs de bicarbonate liés au sodium	- 40 -
1.1.2.1	SLC4A4.....	- 40 -
1.1.2.2	SLC4A5.....	- 41 -
1.1.2.3	SLC4A7.....	- 41 -
1.1.2.4	SLC4A8.....	- 41 -
1.1.2.5	SLC4A10.....	- 42 -
1.1.3	Les autres membres des SLC4.....	- 42 -
1.1.3.1	SLC4A9.....	- 42 -
1.1.3.2	SLC4A11.....	- 43 -
1.2	Autres échangeurs de chlorure et de bicarbonate dans la famille des SLC26.....	- 43 -
1.2.1	SLC26A3.....	- 44 -
1.2.2	SLC26A4.....	- 45 -
1.2.3	SLC26A6.....	- 45 -
1.2.4	SLC26A7.....	- 46 -
1.2.5	SLC26A9.....	- 46 -
2	Objectifs.....	- 47 -
3	Résultats commentés.....	- 50 -
3.1	Préambule.....	- 50 -
3.2	Identification du site de passage des cations dans l'AE1.....	- 51 -
3.2.1	Création des mutants de l'AE1 dans le TM8.....	- 51 -
3.2.2	Mesure de pH_i et de lithium dans l'ovocyte sur wtAE1 et AE1-H734R.....	- 53 -
3.2.3	Effets des réactifs sur les mutants cystéines de l'AE1 sauvage.....	- 53 -

3.2.4	Effets des réactifs sur les mutants cystéines de l'AE1-H734R.	- 55 -
3.2.5	Importance du segment transmembranaire 8.....	- 55 -
3.3	Conformation du site de passage des ions dans l'AE1.	- 55 -
3.3.1	La boucle intracellulaire 690-705.....	- 55 -
3.3.2	Etude des acides aminés et de charges conservés de la séquence 690-705..	- 57 -
3.3.3	Expression des mutants dans l'ovocyte de xénope.	- 58 -
3.3.4	Echange chlorure/bicarbonate des mutants de la séquence 690-705.....	- 60 -
3.3.5	Mesure de la perméabilité aux cations des mutants de la séquence 690-705.	- 61 -
3.3.6	Conclusions sur la boucle intracellulaire 690-705.	- 63 -
3.4	Conductance cationique et échange anionique dans l'AE1.	- 64 -
3.5	Expression de l'AE1 dans la levure.....	- 66 -
3.5.1	Production d'AE1 dans la levure.....	- 67 -
3.5.2	Expression membranaire de l'AE1 dans le plasmide YEpGAL.....	- 68 -
3.5.3	Expression de l'AE1 dans les plasmides pDDGFP-AE1 et pB1-MDhAE1.	- 70 -
3.6	Elaboration d'un modèle tridimensionnel de l'AE1 <i>in silico</i>	- 73 -
3.6.1	Les outils de prédiction.	- 73 -
3.6.2	Choix du modèle de l'étude.	- 75 -
3.6.3	Description et analyse du modèle du domaine transmembranaire de l'AE1.	- 75 -
3.6.4	Validation du modèle tridimensionnel de l'AE1.	- 77 -
3.6.4.1	Mutagenèse dans les segments transmembranaires 3 et 5.	- 80 -
3.6.4.2	Expression des mutants des segments transmembranaires 3 et 5.....	- 80 -
3.6.4.3	Propriétés de transport des mutants du segment transmembranaire 5.	- 82 -
3.6.4.4	Propriétés de transport des mutants du segment transmembranaire 3.	- 86 -
3.6.4.5	Implication des TM5 et TM3 dans la fuite de cation du mutant H734R.....	- 88 -
3.6.4.6	Importance de la position 465 dans l'échange d'ion de l'AE1.	- 91 -
4	Discussion.....	- 95 -
4.1	Le modèle du cotransporteur uracile-proton.....	- 95 -
4.2	Effet des mutations cystéine sur la fonction d'échange de l'AE1.....	- 96 -
4.3	Liaison des réactifs sulfhydriles avec les cystéines.....	- 97 -
5	Matériel et méthodes.	- 103 -

5.1	Construction ADNc avec les mutations ponctuelles de l'hAE1.	- 103 -
5.2	Transformation des bactéries compétentes.....	- 104 -
5.3	Synthèse des ARN pour injection.	- 105 -
5.4	Injection d'ARN dans les ovocytes de xénope.....	- 105 -
5.5	Modèle xénope.	- 106 -
5.6	Mesure des contenus des ovocytes de xénope en sodium et potassium :.....	- 106 -
5.7	Mesure de l'échange chlorure/bicarbonate dans les ovocytes de xénope.	- 107 -
5.8	Mesure des mouvements de lithium dans l'ovocyte de xénope.	- 108 -
5.9	Thioalkylations:	- 109 -
5.10	Biotinylation et préparation des protéines membranaires.	- 109 -
5.11	SDS-PAGE et transfert sur membrane des échantillons.....	- 110 -
5.12	Immunodétection dans les échantillons d'ovocytes.....	- 110 -
5.13	Expression de l'AE1 dans la levure.....	- 110 -
5.13.1	Plasmide pYEPGal.....	- 111 -
5.13.2	Plasmide pDDGFP-2.....	- 111 -
5.13.3	Plasmide pB1-MDhAE1.	- 112 -
5.14	Milieus de culture des levures.....	- 113 -
5.15	Culture des levures.....	- 113 -
5.16	Extraits de levure et préparation des membranes.....	- 113 -
5.17	Gel d'électrophorèse et Western blotting pour les levures.	- 114 -
5.18	Recoupement des données expérimentales et bio statistiques.	- 114 -
6	Références bibliographiques.	- 117 -
7	Annexes.	- 129 -
7.1	Alignement des séquences de l'AE3, l'AE2 et l'AE1.	- 129 -
7.2	Carte du plasmide pSP65-wteAE1.....	- 131 -
7.3	Carte du plasmide pYEPGal.	- 131 -
7.4	Articles publiés.....	- 132 -
7.4.1	Article 1 : Dual Transport Properties of Anion Exchanger : the same transmembrane segment is involved in anion exchange and in a cation leak.	- 132 -
7.4.2	Article 2 : Band 3 missense mutations and stomatocytosis: insight into the molecular mechanism responsible for monovalent cation leak.	- 140 -

7.4.3	Article 3 : Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segment forming the transport site	- 149 -
8	Résumés.	- 162 -
8.1	Résumé en anglais.	- 162 -
8.2	Résumé en français.	- 163 -

Abréviations

AC	Anhydrase Carbonique
AE	Echangeur anionique (de l'anglais Anionic Exchanger)
AQP1	Aquaporine 1
CAII	Anhydrase Carbonique II
Deoxy Hb	Deoxy Hémoglobine
dNTP	déoxyNucléoside 5'-TriPhosphate,
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
G3PDH	Glycéraldéhyde-3-phospho-déshydrogénase
GPA	Glycophorine A
GPB	Glycophorine B
GR	Globule Rouge
H ₂ DIDS	acide 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonique
LB	Luria Broth
LYIA	Lucifer Yellow IodoAcetamide
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MTSEA	aminoethylmethane thiosulfate hydrobromide
MTSET	2-(trimethylammonium)ethylmethane thiosulfonatebromide
oo	ovocyte
pCMBS	p-chloromercuribenzenesulfonate
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PDB	Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/home/home.do)
PM	Poids moléculaire
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Rh	Rhésus
RhAG	Glycoprotéine associée à Rh
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl sulfate)
TM	Trans-Membranaire
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane,

Introduction

1 Introduction : les transporteurs de bicarbonate.

L'homéostasie est le maintien de l'ensemble des paramètres physico-chimiques d'un organisme. Ces paramètres: glycémie, température, taux de sel dans le sang, pH, etc. doivent rester relativement constants. La stabilité du milieu intérieur (équilibre hydrique, équilibre électrolytique, équilibre acido-basique) est essentielle. C'est cet équilibre dynamique qui permet d'assurer le bon fonctionnement de tous les processus cellulaires et la survie des organismes.

La régulation du pH et le maintien des gradients d'ions dans l'organisme sont deux composantes essentielles de cette homéostasie. Au niveau moléculaire et cellulaire l'homéostasie acido-basique passe par la régulation des tampons cellulaires de l'organisme. Le couple bicarbonate/ CO_2 est le tampon majoritaire de l'organisme chez l'homme. Il permet une régulation fine du pH dans l'organisme. Dans le règne animal, ce tampon est régulé grâce à l'intervention de canaux et de transporteurs dont les caractéristiques sont précisées dans les chapitres qui suivent.

Les transporteurs impliqués dans l'homéostasie du tampon cellulaire CO_2 /bicarbonate sont regroupés dans deux familles de gènes distincts les *SLC4* et les *SLC26*.

1.1 La famille des *SLC4*.

La famille des *SLC4* (pour « SoLute Carrier family 4 » ou, en français, « transporteur de solutés famille numéro 4 ») compte 10 membres, numérotés de A1 à A11 (le numéro 6 n'étant pas utilisé). Si ce n'est pas une famille très nombreuse, comme la grande famille des canaux potassiques par exemple, elle se distingue par une grande diversité dans le fonctionnement de ses membres ainsi que dans leur répartition tissulaire et leur lieu d'expression cellulaire ou subcellulaire. Leur regroupement au sein d'une même famille est principalement dû aux solutés pris en charge (bicarbonate dans la majorité des cas) et/ou leur identité de séquence d'acides aminés. Ces protéines sont réparties en 3 sous-familles (figure 1) : les échangeurs anioniques chlorure/bicarbonate électroneutres regroupant les *SLC4A1*, *SLC4A2* et *SLC4A3*, les transporteurs sodium/bicarbonate comptant les membres *SLC4A4* jusqu'à *SLC4A8* plus le *SLC4A10*. Enfin les deux derniers membres sont regroupés à part car ils n'entrent pas dans les deux précédentes sous-familles : le *SLC4A9* et le *SLC4A11* respectivement échangeur

chlorure/bicarbonate (Lipovich *et al.*, 2001) et cotransporteur borate/sodium (Parker *et al.*, 2001). Ces protéines peuvent, de manière satisfaisante, être regroupées selon leur fonction sur un arbre phylogénique fait à partir de leur séquence d'acides aminés (figure 1).

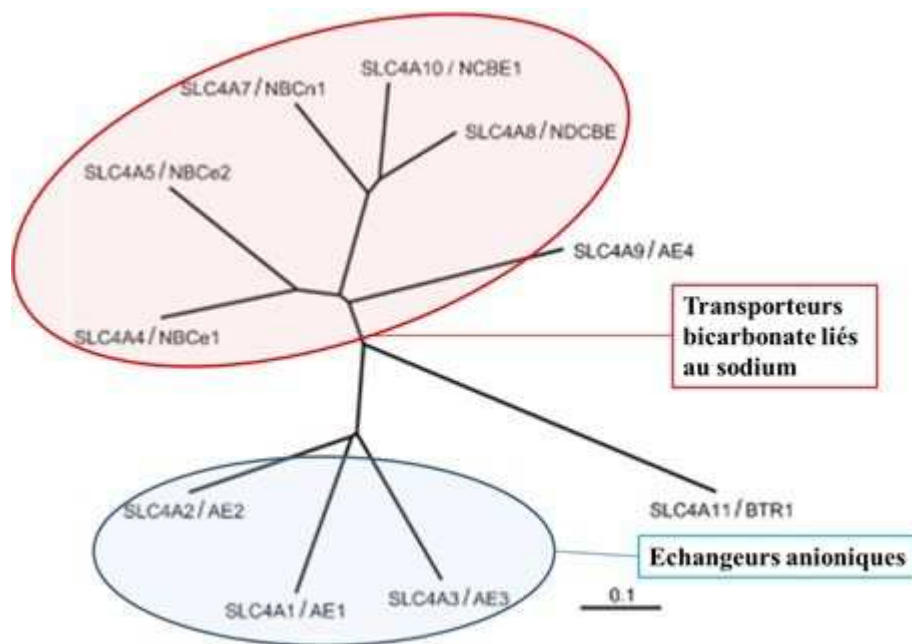


Figure 1. Arbre phylogénique des SLC4.

D'après la « Fig. 1 SLC4 family tree » de (Romero *et al.*, 2004).

Cet arbre a été construit en utilisant des séquences d'acides aminés d'un variant d'épissage pour chacun des dix gènes slc4. Romero *et al.* ont utilisé Clustal W pour construire l'arbre phylogénique (Clustal W est disponible en libre accès sur www.ebi.ac.uk/clustalw/).

1.1.1 Echangeurs anioniques électroneutres indépendants du sodium.

Les trois échangeurs anioniques électroneutres de la famille SLC4 : A1, A2 et A3, effectuent un échange mole à mole de chlorure contre du bicarbonate. Ils sont qualifiés d'électroneutres car l'échange qu'ils effectuent met en jeu deux espèces chargées négativement : le chlorure, Cl^- , et le bicarbonate, HCO_3^- principalement. Ces trois protéines fonctionnent de manière sodium-indépendante.

1.1.1.1 SLC4A1.

Le gène *SLC4A1* code pour l'AE1. Cette protéine est la protéine modèle de cette étude et de cette famille. Historiquement la première clonée et étudiée, elle a servi de modèle pour décrire les autres membres des SLC4.

1.1.1.1.1 Historique et découverte.

L'AE1 fait partie d'une famille de protéines membranaires appelée SLC4 et est le prototype de la sous-famille des échangeurs anioniques électroneutres dont elle fait partie. Il s'agit de la plus étudiée des 3 membres de cette sous-famille. Elle a été mise en évidence beaucoup plus tôt que les autres membres de la famille SLC4 à cause de son abondance dans les érythrocytes: un érythrocyte humain peut compter jusqu'à 1 million de copies de cette protéine dans sa membrane plasmique à un instant t. Ce chiffre représente environ 30% des protéines détectables à la membrane cellulaire.

C'est lors de la mise au point de la technique du SDS-page que l'AE1 va hériter de son nom vernaculaire. En effet la référence « bande3 » est due à sa position dans un SDS-page fait à partir de préparation membranaire d'érythrocytes humains (Figure 2).

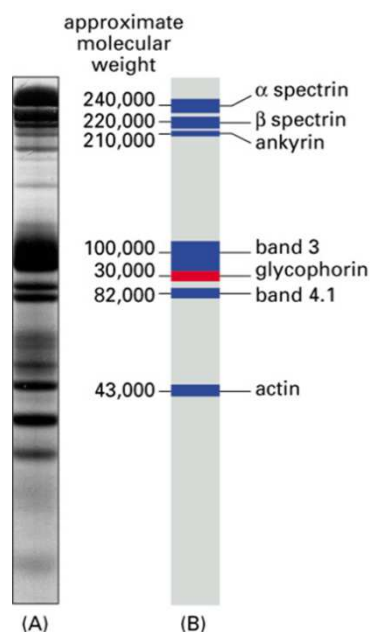


Figure 2. SDS-PAGE des protéines de globule rouge humain.

Figure tirée de « Molecular biology of the cell, 4th edition » figure 10-29. Sur cette préparation on peut visualiser environ 15 bandes majeures entre 15 et 250kDa. La bande représentative de la glycophorine A (marquée en rouge dans la partie (B) de la figure) est confondue avec la bande 3 très étalée.

Le globule rouge a été un des premiers modèles cellulaires utilisé à cause de ses nombreux avantages : facilement disponible, facile à isoler, pas de noyau ni d'organite interne. Il n'est de plus composé que d'une seule membrane (la membrane plasmique). Les protéines de ce SDS-Page « historique » ont par la suite été identifiées (tableau A) et clonées.

Tableau A : Identification des bandes visibles sur un SDS-PAGE fait à partir de globules rouges humains.

SDS-PAGE	Poids moléculaire		Protéine	Nombre aminoacides
	apparent	calculé		
bande 1	240	281	α spectrine	2429
bande 2	220	246	β spectrine	2137
bande 2.1	210	206	Ankyrine 1	1880
bande 2.9	97	80	β adducin	726
bande 3	90-100	102	AE1	911
bande 4.1a & 4.1b	78 & 80	66	Protéine 4.1	588
bande 4.2	72	77	Protéine 4.2	691
bande 4.9	48 & 52	43	Dermatine	383
	46 & 55	53	p55	466
bande 5	43	42	β actine	375
	43	41	Tropomoduline	359
bande 6	35	36	G3PD	335
bande 7	31	32	Stromatine	288
	27 & 29	28	Tropomyosine	239

D'abord clonée chez la souris (Kopito *et al.*, 1985), puis chez l'homme trois ans plus tard (Tanner *et al.*, 1988), la bande 3 est une des premières protéines membranaires clonée et séquencée référencée dans la littérature.

1.1.1.1.2 Localisation de l'AE1.

Chez l'homme, l'AE1 s'exprime essentiellement dans les érythrocytes et les cellules intercalaires du canal collecteur du rein (Kopito *et al.*, 1985, Tanner *et al.*, 1988). En dehors de ces deux lieux d'expression l'AE1 n'a été détecté qu'au niveau du cerveau pendant le développement mais pas chez l'adulte et à un faible niveau dans les myocytes cardiaques. Au niveau cérébral, pendant le développement embryonnaire il semble agir comme un échangeur général de substitution avant son remplacement par les autres échangeurs anioniques l'AE2 et/ou l'AE3 chez le nouveau-né. Chez l'homme, les deux localisations érythrocytaires et rénales, sont associées à deux isoformes différentes issues d'épissages alternatifs de l'AE1. Ces protéines eAE1 et kAE1, respectivement exprimées dans les érythrocytes et le rein humain diffèrent par leur partie N-terminale. La protéine kAE1 est transcrite à partir d'un promoteur alternatif et est tronquée de 65 acides aminés (figure 3).

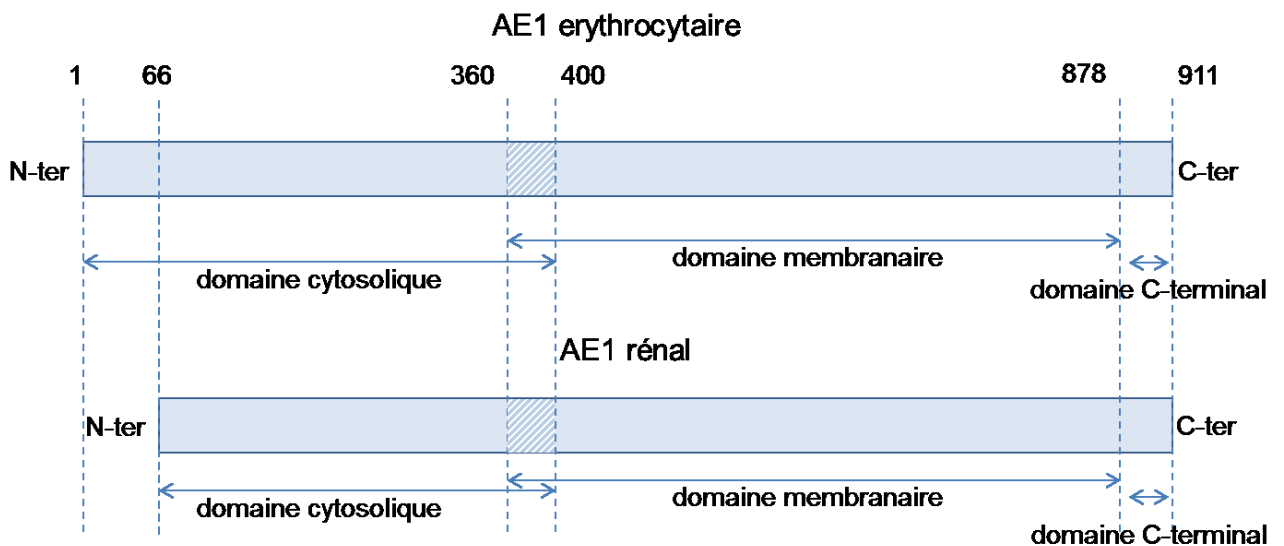


Figure 3 : Schéma illustrant les différences entre les versions érythrocytaire et rénale l'AE1.

La différence entre des deux versions de l'AE1 se fait au niveau N-terminal où la version rénale est tronquée des 66 premiers acides aminés. La délimitation entre les domaines membranaire et cytosolique varie selon les études. Elle est généralement située entre les acides animés 360 et 400 de la version érythrocytaire.

1.1.1.1.3 Structure moléculaire.

La structure de l'AE1 est caractéristique des protéines de sa famille. Elle est constituée de deux gros domaines structuraux représentant chacun à peu près 50% de la protéine : une partie cytoplasmique N terminale (N-ter) et un domaine transmembranaire avec l'extrémité carboxy-terminale (C-ter) cytoplasmique (figure 4).

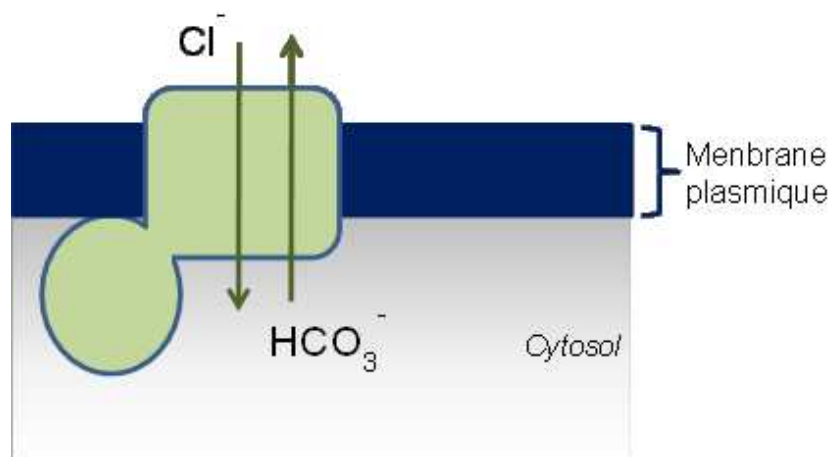


Figure 4 : Représentation schématique de l'AE1.

L'AE1 est une protéine membranaire qui peut se représenter par 2 domaines structuraux : un domaine N-terminal cytosolique et un domaine C-terminal membranaire, siège de son activité d'échange ionique.

Les deux domaines structuraux de l'AE1 fonctionnent de manière indépendante. La partie intracellulaire est responsable de l'interaction avec l'ensemble de ses partenaires cellulaires tandis que la partie transmembranaire est responsable de l'activité de transport.

1.1.1.1.3.1 *Domaine cytoplasmique N terminal.*

Le domaine cytoplasmique de l'AE1 a été cristallisé (figure 5) et l'étude de cette structure a permis de localiser les sites importants pour la fixation de l'AE1 à ses différents partenaires protéiques dans le globule rouge.

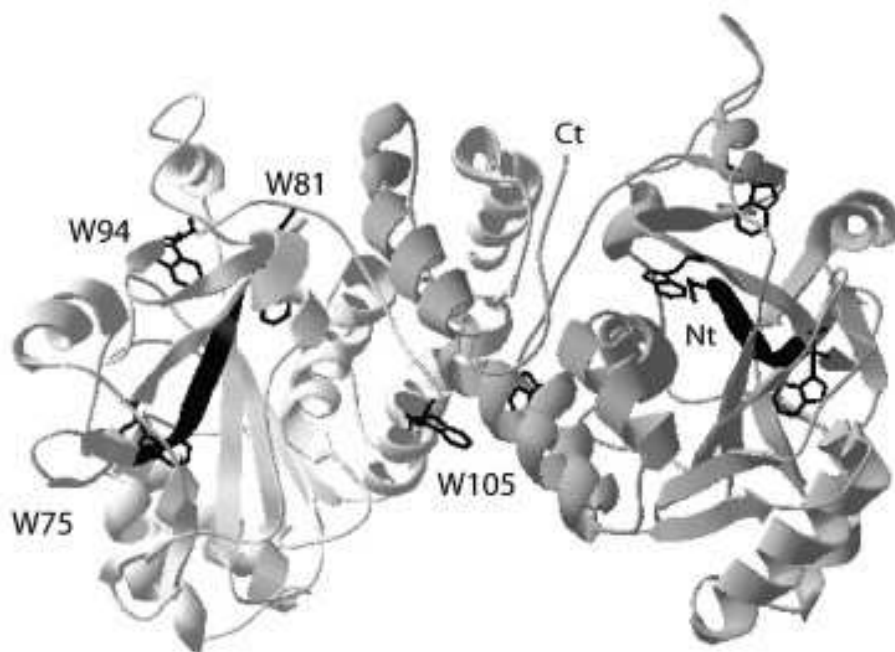


Figure 5 Modèle tridimensionnel de la partie N-terminale de l'AE1.

Figure originalement publiée *AJ. Pang, Biochemistry 2008* « Figure 1: Crystal structure of the cytosolic domain of human AE1 (cdAE1) » (Pang *et al.*, 2008)

La structure du domaine cytoplasmique de l'AE1 a été résolue à 2,9 Å à pH 4,8. Sur cette représentation chaque monomère est représenté avec une teinte de gris différente et la partie regroupant des acides aminés 1 à 66 de chaque monomère est représentée en noir. Ces acides aminés 1-66 est la partie manquante dans la version rénale de l'AE1 par rapport à la version érythrocytaire.

Les principales protéines en interaction avec l'AE1 via sa partie intracellulaire sont l'ankyrine qui sert de liaison avec le cytosquelette de spectrine, la protéine 4.2, la deoxy-hémoglobine, l'aldolase (Hargreaves *et al.*, 1980, Chu *et al.*, 2006). Le trio de protéine bande3, ankyrine et protéine 4.2 est très important pour la déformabilité du globule rouge (figure 6). C'est grâce à cette association que le globule rouge va avoir sa forme caractéristique.

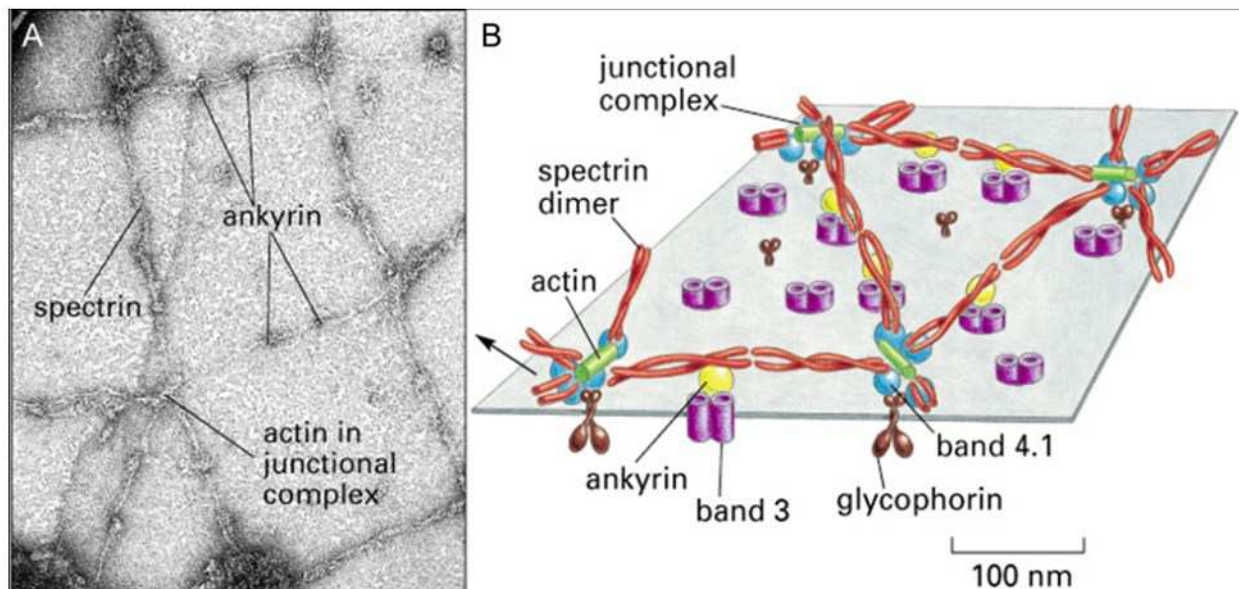


Figure 6. Cytosquelette de spectrine d'un globule rouge.

Figure tirée de « Molecular Biology of the Cell », 4th Edition, Figure 10-31.

(A) Spectrine du cytosquelette de la face cytosolique du GR humain en microscopie électronique (coloration négative)

(B) Interprétation en schéma de la structure interne de la membrane plasmique d'un globule rouge. **actine** (13 monomères), **bande 4.1**, **spectrine**, **ankyrine**, **bande 3**, et **glycophorine**.

L'AE1 via son interaction avec la protéine 4.2 permet la formation de macrocomplexes protéiques importants (figure 7) dans la membrane regroupant un grand nombre de protéines notamment les protéines rhésus (RhAG et Rh) (Bruce *et al.*, 2003).

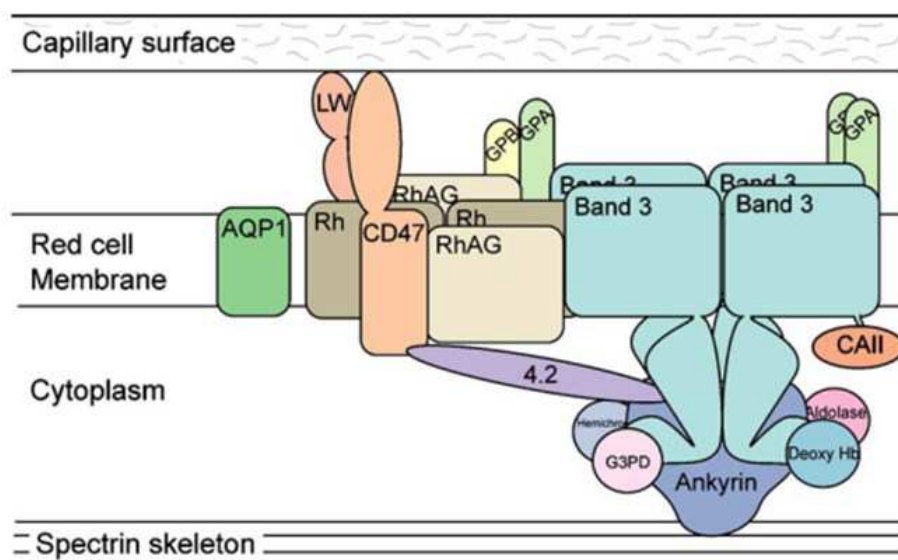


Figure 7. Macrocomplexe de l'AE1 dans les érythrocytes.

Originellement publié par L.J. Bruce, Blood, 2003 avec le titre « Fig. 6. Band 3 macrocomplex and proposed gas exchange metabolon ». (Bruce *et al.*, 2003)

Abbreviations : AQP1 (Aquaporine1), Rh (Rhésus), RhAG (Glycoprotéine associée à Rh), 4.2 (Protéine 4.2), Ankyrin (Ankyrine), Deoxy Hb (Deoxy Hémoglobine), CAII (Anhydrase Carbonique II), GPA (Glycophorine A), GPB (Glycophorine B).

Les protéines représentées sur le schéma de L.J. Bruce sont en interaction avec l'AE1 : directe (interaction protéine-protéine), indirecte (par l'intermédiaire de la protéine 4.2 ou de l'Ankyrine) ou fonctionnelle (pour l'AQP1).

La boucle de fixation de l'ankyrine est composée des résidus $_{175}\text{PAVLTRSGDPS}_{185}$ qui forment une boucle entre 2 feuillets β configurés en épingle à cheveu ou « bêta-hairpin loop » (figure 8).

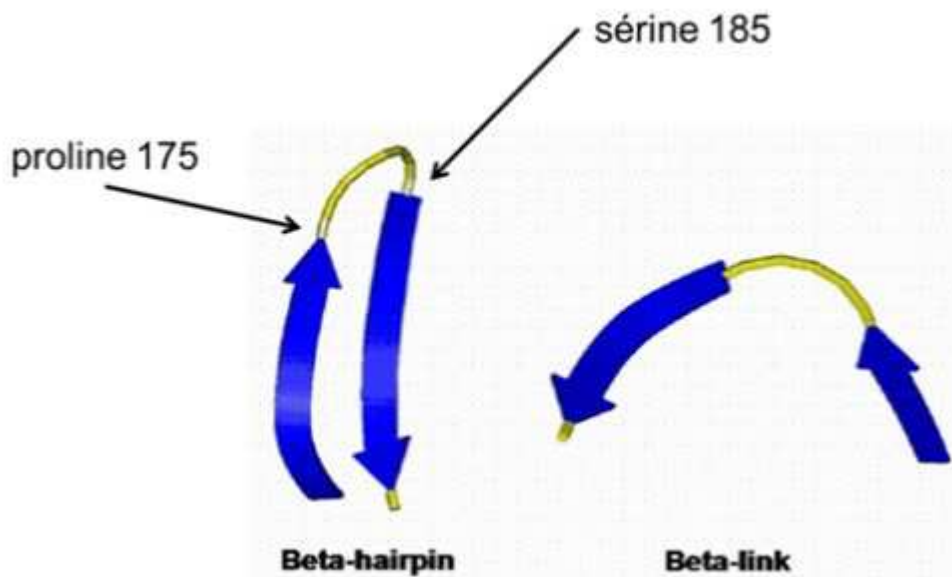


Figure 8. Boucle de fixation de l'ankyrine en « bêta-hairpin » sur l'AE1.

Sur ce schéma, la boucle $_{175}\text{PAVLTRSGDPS}_{185}$ est stabilisée par l'interaction des deux feuillets β (à gauche) en aval et en amont. La boucle ainsi stabilisée va servir de site d'interaction avec l'ankyrine. Cet arrangement en « bêta-hairpin » est plus stable que la succession simple de deux feuillets beta (à droite).

En parallèle il a aussi été montré que la partie intracellulaire de l'AE1 permettait de fixer ou de réguler l'organisation de nombreuses autres protéines associées à la membrane notamment des enzymes comme l'aldolase, la phosphofructokinase et la glycéride-3-phosphate déshydrogénase dans les globules rouges (Low, 1986, Perrotta *et al.*, 2005).

JA. Walder a aussi pu mettre en évidence un site de liaison à la desoxyhémoglobine constitué des acides aminés $_{1}\text{MEELQDDYEDE}_{11}$, lorsque la méthionine en position 1 est N-acétylée (Walder *et al.*, 1984). Une publication plus récente de 2005 a montré que ce site de liaison de 11 acides aminés pouvait aussi interagir avec d'autres protéines comme l'aldolase (Perrotta *et al.*, 2005).

La version rénale de l'AE1, kAE1, débutant au niveau de l'acide aminé 66 est donc dépourvue de cette séquence clé dans les interactions protéine-protéine de l'AE1 et a donc un rôle structural bien moins important que dans le globule rouge.

L'AE1 existe sous forme de dimères et de tétramères présents au sein d'un complexe macromoléculaire ordonné comportant un grand nombre de protéines associées aux membranes érythrocytaires (Bruce *et al.*, 2003). Mais la formation de ces tétramères de manière stable ne semble possible que via une interaction commune avec les autres

partenaires intracellulaires de l'AE1 (ankyrine...). Grâce à l'étude du cristal de la partie N-terminale de l'AE1 D. Zhang propose que l'ankyrine puisse forcer l'association en tétramère de l'AE1 (Zhang *et al.*, 2000). En revanche l'association en dimères reste possible sans intervention de l'ankyrine.

1.1.1.1.3.2 Domaine transmembranaire de l'AE1.

Des analyses de sang de patients ayant des groupes sanguins atypiques ont permis d'affiner les données topologiques de ce domaine transmembranaire.

En effet, le domaine transmembranaire de l'AE1 est associé au groupe sanguin Diego. A l'origine le nom de Diego est caractéristique d'une mutation précise P854L qui a été caractérisée sur des membres d'une famille d'Amérique centrale. L'appellation « Diego » a ensuite été élargie pour former le système « Diego » regroupant les mutations ponctuelles portant sur des boucles extracellulaires de l'AE1, caractéristiques d'un antigène particulier. Le système Diego a été inclus dans la nomenclature OMIM™ (« *Online Mendelian Inheritance in Man* ») et utilisé par la Société Internationale de Transfusion Sanguine (SITS) pour définir le groupe sanguin chez l'homme. Il existe 28 mutations répertoriées dans le système Diego. Certaines de ces mutations affectent l'échange chlorure bicarbonate des globules rouges humains. Les allèles les plus courantes sont Di^b et Di^a, qui correspondent à la mutation historique sur la position 854 (ayant une proline pour Di^b ou une leucine pour Di^a).

Pour une revue sur les systèmes de groupes sanguins voir : Daniels GL. et al. « Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens », Vox Sanguinis, 2004. Sur le système Diego, Dean L., « Blood Groups and Red Cell Antigens », 2005.

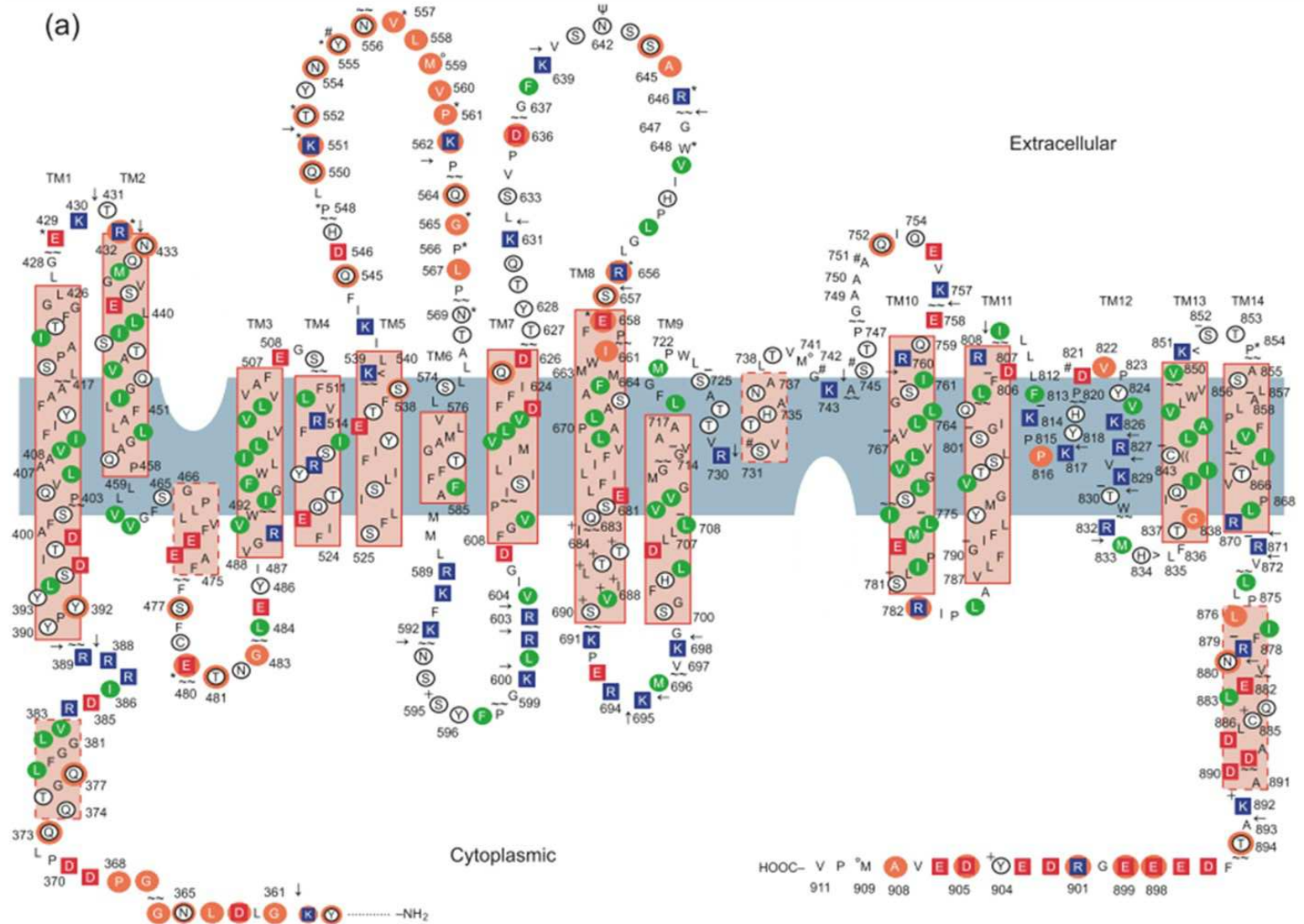
Les données de biochimie ont apporté beaucoup d'informations et ont permis l'élaboration des modèles topologiques actuellement utilisés (figure 9). Ces deux modèles regroupent l'ensemble des données biochimiques qui ont été publiées sur l'AE1. Ils prennent en compte la plupart des données disponibles et permettent d'avoir une vision des différentes interprétations de ces données dans la littérature.

Figure 9. Modèles topologiques de l'AE1.

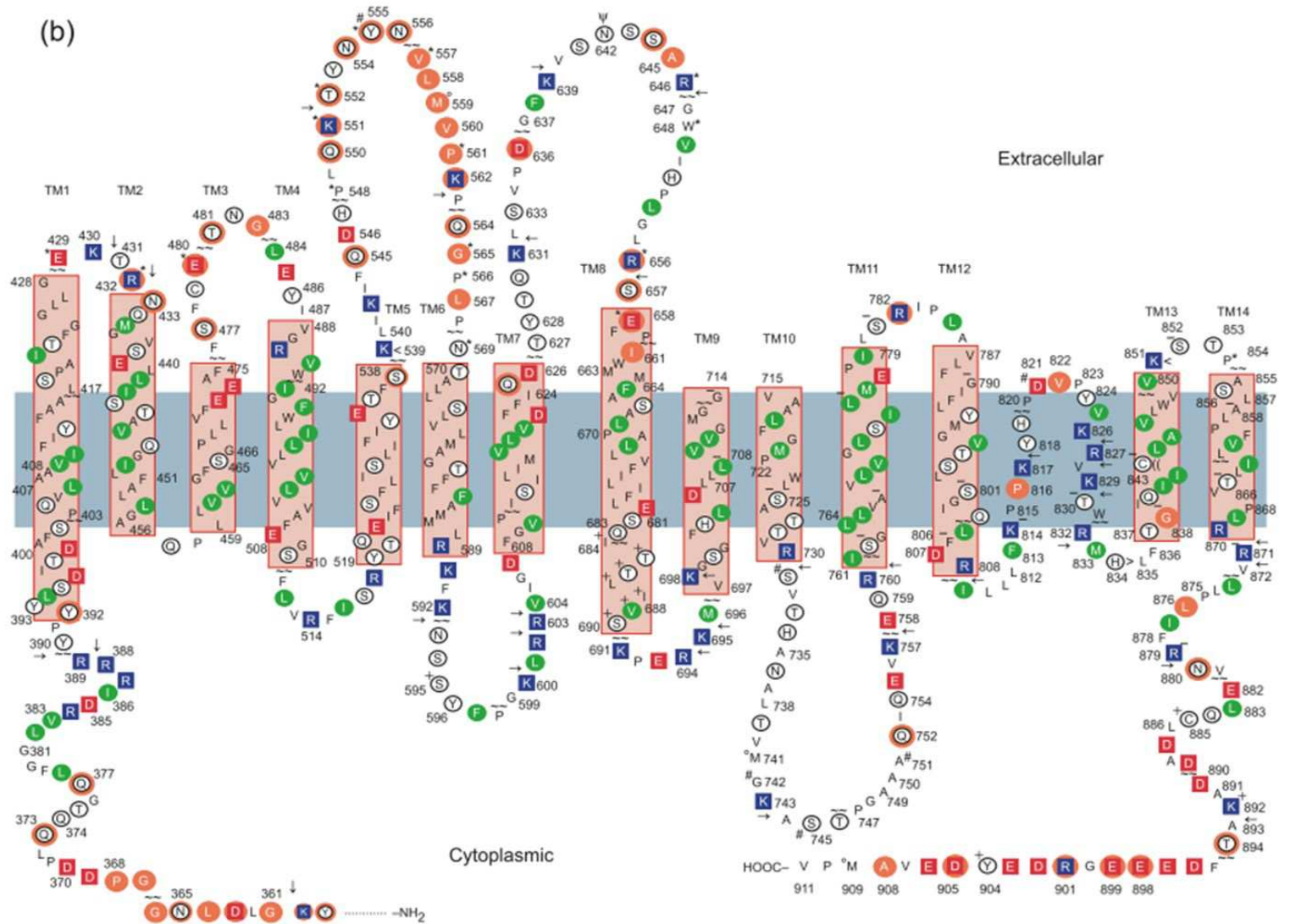
D'après Hirai T. et al. 2011. « Topology models of the AE1 membrane domain with anti-parallel V-shaped motifs ». (Hirai et al., 2011)

Le modèle (a) est calqué sur un modèle de protéine CIC alors que le modèle (b) n'est aligné que de manière partielle au niveau de certains motifs.

- Les lettres dans les carrés rouges ou bleus indiquent respectivement les résidus chargés négativement ou positivement. Les lettres encadrées indiquent des résidus hydrophiles.
- Les hélices transmembranaires sont encadrées par des traits pleins. Les autres hélices hypothétiques sont encadrées par des pointillés sur la partie (a).
- Les acides aminés hydrophobes sont visualisés grâce à des cercles verts.
- L'alignement de 28 séquences de protéines de la famille des AE (Yamaguchi *et al.*, 2010b) a permis de déterminer des positions qui comprennent au moins trois des cinq types de résidus possibles (hydrophobes, polaires, basiques, acides ou une lacune), et des sites où les résidus ont une grande variabilité. Ils sont marqués par des cercles pleins avec un fond orange.



- Les positions des lacunes dans l'alignement sont marquées par un tilde « ~ ».
- Les sites antigéniques des groupes sanguins (Poole, 2000) sont marquées d'un astérisque « * ».
- Les sites de clivage par la trypsine sont indiqués par une flèche (Kang *et al.*, 1992, Abe *et al.*, 2006).
- Les sites de liaison pour les inhibiteurs sont marqués par « < » pour le H₂DIDS (K539 et K851) (Okubo *et al.*, 1994) et « > » pour le DEPC (H834) (Jin *et al.*, 2003). « Ψ » est utilisé pour le site de glycosylation (N642), « (» pour le site de liaison du palmitate (C843), et « ° » pour les méthionines oxydées (M559, M741 et M909) (Li *et al.*, 2006).
- Les sites étudiés par balayage des cystéines dont la localisation est extracellulaire, intracellulaire ou à l'intérieur de la membrane (inaccessibles) par « # », « + » et « - », respectivement (Fujinaga *et al.*, 1999).



Le domaine transmembranaire commence vers l'acide aminé 381. En effet, T. Kanki *et al.* dans une étude de 2003 parviennent à inhiber le transport de chlorure en introduisant une délétion $\Delta G_{381}LVRD$ du côté intracellulaire de l'AE1 sans modifier l'expression membranaire de la protéine (Kanki *et al.*, 2003).

Les acides aminés $_{400}AFSPQVLAA_{408}$ sont associés à une pathologie érythrocytaire humaine la SAO ou « Ovalocytose du sud-est asiatique ». De nombreuses études ont positionné ces acides aminés du côté intracellulaire de l'AE1, juste en amont du premier segment transmembranaire (Liu *et al.*, 1990).

L'arginine 432 et l'acide glutamique 429 font partie d'un épitope extracellulaire et sont positionnés dans une boucle extracellulaire de l'AE1 (Poole, 2000). Ces deux acides aminés encadrent la lysine 430 qui avait été identifiée par liaison extracellulaire dans une autre étude (Cobb *et al.*, 1990).

D'après P. Jarolim, l'acide glutamique 480 est positionné dans une boucle extracellulaire de la protéine car une mutation ponctuelle E480L est caractéristique de l'antigène Fr(a) du Système Diego (Jarolim *et al.*, 2004).

Dès 1983, Brock a identifié deux segments transmembranaires par des expériences de liaison intra et extracellulaire de fragments de l'AE1 obtenus par digestion de la protéine par la trypsine (Brock *et al.*, 1983). Ces segments s'étendent de la proline 528 à lysine 592 et de la lysine 600 à l'isoleucine 624. Cette étude positionne aussi certains résidus par rapport à la membrane notamment la tyrosine 628 du côté extracellulaire, grâce à des expériences de radio-iodation réalisées par MJ. Tanner quelques années auparavant. Cette étude reprend aussi des observations de Passow (Passow *et al.*, 1980) qui avait identifié 5 acides aminés chargés, par des liaisons d'inhibiteurs, comme faisant partie du système de translocation d'ions à l'intérieur de cette séquence d'étude.

Le fragment d'étude de Brock et al constitue, sur le modèle topologique couramment utilisé, les segments transmembranaires 6 et 7 comme le confirmeront des études ultérieures. Tanner publie en 1988 des études basées sur des digestions enzymatiques de l'AE1 et identifie un site majeur de coupure à la chymotrypsine au niveau de la tyrosine 553 qu'il positionne du côté extracellulaire de la protéine. Ces données sont corroborées en 1999 par Fujinaga qui positionne la tyrosine 555 en amont du TM6 dans une boucle du côté extracellulaire (Fujinaga *et al.*, 1999). Grâce à des expériences de balayage des cystéines, Popov, en 1997, a positionné l'isoleucine 624 à la fin du TM7 (Popov *et al.*, 1997).

La boucle qui suit le TM7 est extracellulaire, cela est confirmé par Tanner en 1988 qui confirme la position de la séquence $_{637}GFKVSNSSARGW_{648}$ en identifiant l'Asparagine 642 comme site de N-glycosylation de la protéine.

Par la suite une publication de Tang (Tang *et al.*, 1998) identifie la séquence ⁶⁵⁶RSEFPIWM₆₆₃ comme faisant partie du vestibule de l'AE1 grâce à des expériences de mesure de l'accessibilité au LYIA, «Lucifer Yellow IodoAcetamide ». Selon cette étude cette séquence se situe du côté extracellulaire et forme la porte d'entrée du vestibule de l'échangeur en amont du segment transmembranaire 8 Ce vestibule mène directement à la glutamine 681 en fin du TM8 qui a été mise en avant par Jennings. Jennings et ses partenaires ont en effet montré l'implication de ce résidu dans la modulation de l'activité de (Jennings *et al.*, 1987, Jennings *et al.*, 1988, Jennings *et al.*, 1992). L'importance de ce résidu a de nouveau été démontré par Sekler, indirectement, par des expériences de mutagénèse sur l'acide aminé homologue dans l'AE2 quelques années plus tard (Sekler *et al.*, 1995b).

Par la suite, l'équipe de Joe Casey a montré que certains acides aminés appartenant à ce segment transmembranaire 8 bordent le pore de translocation des anions. Grâce à des expériences de balayage des cystéines ils ont identifiés l'alanine 666, la sérine 667, les leucines 669, 673, 677 et 680 et les isoleucines 684 et 688 (Tang *et al.*, 1999). A partir de leurs observations, ils ont aussi proposé que ce segment transmembranaire forme une hélice $\alpha_{3,6}$ qui dépasse la membrane plasmique du côté intracellulaire d'au moins deux tours, impliquant donc au moins 8 acides aminés supplémentaires.

Ericksson a positionné la lysine 691 du côté intracellulaire de l'AE1 dans une boucle entre les segments transmembranaires 8 et 9 (Erickson *et al.*, 1998). D'après cette étude, la boucle contient au minimum les acides aminés ⁶⁸⁸IVSKPER₆₉₄.

Par des études d'hydrophobicité, à partir de la séquence des aminés, le segment transmembranaire 9 a été identifié. Selon les sources les limites de ce segment diffèrent. Par consensus il est admis qu'il s'étende de la glycine 701 à la phénylalanine 719 sous la forme d'une hélice $\alpha_{3,6}$. Par contre il a été montré que les acides aminés : sérine 731, glycine 742, sérine 745 et alanine 751 étaient accessibles du côté extracellulaire de l'AE1 (Fujinaga *et al.*, 1999). Parallèlement une étude de Kuma en 2002 montre, par des expériences de protéolyse ménagée, que la lysine 743 n'est pas accessible du côté extracellulaire (Kuma *et al.*, 2002). Ces observations de Kuma confirment les conclusions de Popov en 1997 qui n'a pas réussi à glycosyler le mutant K743N de l'AE1 (Popov *et al.*, 1997). A partir de ces observations plusieurs auteurs ont proposé l'existence d'une boucle réentrante dans la bicouche lipidique entre les segments transmembranaires 9 et 10. Cette boucle semble critique pour les fonctions de transport de l'AE1. En effet comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette zone de la protéine comporte des acides aminés qui sont impliqués dans des pathologies humaines liées à l'AE1.

D'après Popov, la leucine 764 est au début du segment transmembranaire 10 (Popov *et al.*, 1997).

Les deux modèles présentés sur la figure 9 ont une asymétrie dans la structure des segments transmembranaires. Dans le cas de la figure 9a, le TM12 n'est pas une simple hélice et n'a pas de structure bien définie. Dans le cas de la figure 9b, il y a une boucle cytoplasmique entre les TM 12 et 13 qui positionne les acides aminés 821, 822 et 823 du côté extracellulaire. En raison d'un manque d'informations structurales, plusieurs régions demeurent ambiguës dans la topologie de l'AE1. Il est difficile de choisir un modèle de topologie à cause de plusieurs résultats expérimentaux contradictoires. Hirai qui a proposé ces modèles (figure 9) avance qu'il pourrait y avoir un meilleur modèle topologique "hybride". L'ambiguïté dans la définition de la topologie de certaines régions de la séquence peut indiquer, selon cet auteur, que ces régions sont dynamiques et impliquées dans le mécanisme de transport.

Les études sur la fin de la partie membranaire de l'AE1 sont moins nombreuses. Ainsi la présence des derniers segments transmembranaires (notés TM12, TM13 et TM 14 sur la figure 9) et leur délimitation sont principalement basées sur des études d'accessibilité d'acides aminés au solvant (Zhu *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2004) et le profil hydropathique de la protéine. Selon les modèles, il existe deux ou trois hélices $\alpha_{3,6}$ traversant la membranes formant ces segments transmembranaires.

Les acides aminés $^{852}\text{STPA}_{855}$ se sont révélés accessibles à la biotine maléimide et au bromure de bromotriméthylammoniumbimane (qBBBr) qui est un réactif imperméant aux membranes. De plus, la lysine 851 est un site de fixation pour le H_2DIDS (Okubo *et al.*, 1994). La séquence $^{851}\text{KSTPA}_{855}$ est donc extracellulaire. En revanche, les acides aminés encadrant $^{851}\text{KSTPA}_{855}$ (Phe836 à Val850 et Ser856 à Arg871) ne sont pas accessibles au solvant et formeraient les deux derniers segments transmembranaires de l'AE1.

Les résidus 872 à 885 sont marqués par la biotine maléimide, mais pas par qBBBr imperméant, ce qui suggère qu'ils sont situés dans le cytoplasme.

Cette configuration s'appuie aussi sur le fait que la mutation P854L est une caractéristique antigénique du groupe sanguin Diego (Di a) (Bruce *et al.*, 1994), et son emplacement dans ce cas est extracellulaire.

1.1.1.1.3.3 Partie C-terminale de l'AE1.

La partie C-terminale de l'AE1 est très réduite elle compte entre 30 et 39 acides aminés selon les données et plusieurs revues, en s'appuyant sur des analyses hydropathiques, proposent que cette partie comporte une hélice $\alpha_{3,6}$. Cette partie C-terminale est entièrement intracellulaire et comporte une zone d'interaction avec l'anhydrase carbonique II, $^{886}\text{LDADD}_{890}$ (Mori *et al.*, 1995, Vince *et al.*, 2000a, Vince *et al.*, 2000b). Cette interaction est très importante dans le globule rouge ou elle potentialise l'action de l'AE1. Cela se traduit de manière locale en une

augmentation de la concentration en ion bicarbonate au niveau du site de transport de l'AE1 (Sowah *et al.*, 2011).

Une analyse de coupure à la trypsine réalisée sur cette partie C-terminale n'a permis de réaliser qu'une seule coupure entre les acides aminés 892 et 893 (Mori *et al.*, 1995), alors qu'une analyse de séquence prévoit des sites potentiels de coupure après les acides aminés 871, 879 et 892. Ceci suggère que cette région est résistante à la trypsine, sauf entre les résidus 892 et 893. Ces données ont permis de situer une hélice $\alpha_{3,6}$ entre les acides aminés Pro875 et Lys892.

Une délétion de la partie $_{901}\text{RDEYDEVAMPV}_{911}$ de la protéine a été liée à une pathologie humaine (voir partie « Maladies humaines liées au SLC4A1 »). La délétion serait responsable d'un mauvais adressage de la protéine dans les cellules rénales.

1.1.1.1.4 Fonction d'échange d'anions de l'AE1.

La perméabilité aux anions dans les globules rouges est principalement due à l'AE1. L'AE1 effectue un échange strict d'un anion contre un anion au travers de la membrane plasmique. Des analyses cinétiques ont montré que cet échange d'anion s'effectuait via un mécanisme séquentiel « ping-pong » (Gunn *et al.*, 1979, Passow, 1986). Ce modèle de fonctionnement prévoit qu'il n'existe qu'un seul site de transport des ions qui est soit ouvert vers l'extérieur soit ouvert vers l'intérieur de la cellule. Le passage de la forme ouverte vers l'extérieur à la forme ouverte vers l'intérieur se fait lorsque le substrat interagit avec le site de transport de la protéine.

J. Brock propose un modèle de propagation des anions dans la protéine (figure 10) (Brock *et al.*, 1983).

Ce mouvement d'ions au sein de la membrane implique, selon cette étude, que « les changements de conformation entre ces formes ne se produisent que si le substrat est lié au site de transport. ».

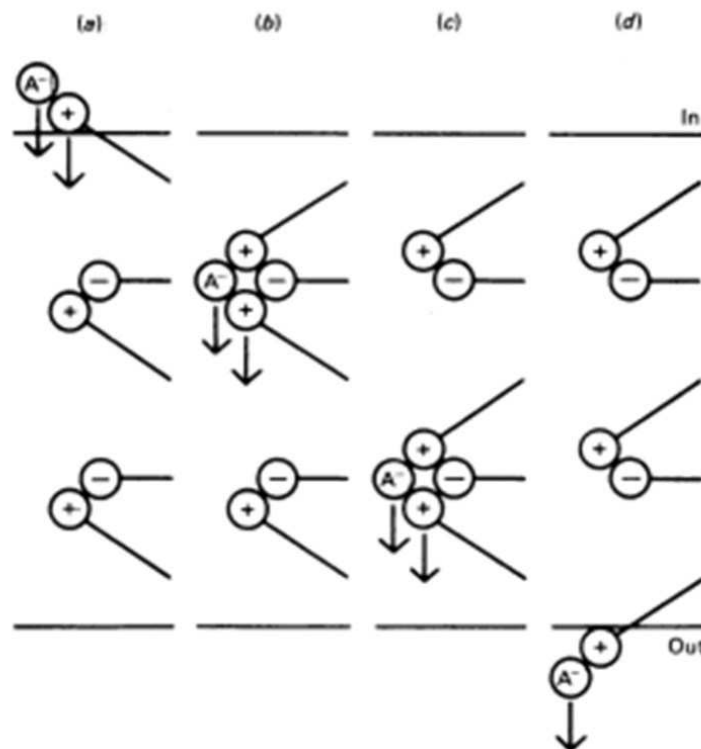


Figure 10. Modèle de propagation des anions dans l'AE1.

Originellement proposé par J. Brock dans *Biochem J*, en 1983 avec le titre « Fig. 6 Anion-propagation model. »

(Brock et al., 1983)

Un anion (A^-) se lie du côté intracellulaire (« In ») et traverse la membrane plasmique jusqu'au côté extracellulaire (« Out ») en s'associant avec différents acides aminés chargés positivement (+) ou négativement (-), appartenant à l'AE1, positionnés dans la bicouche lipidique.

Plusieurs résidus ont été impliqués dans le mécanisme d'échange d'anions (Zhu et al., 2004). Sur la base de preuves indirectes, Passow a proposé un modèle de translocation d'anions qui implique des résidus des segments transmembranaires (TM) 1, 5, 8, 10, 12 et 13 (Passow, 1986). De plus, Jennings et Smith ont montré l'importance des résidus du segment transmembranaire 8, notamment le glutamate 681, dans le processus de transport (Jennings et al., 1992). Une modification chimique de ce résidu conduit à modifier la cinétique d'échange d'anions selon les auteurs. Le rôle fonctionnel du glutamate 681 de l'AE1 a été confirmé par des expériences de mutagenèse chez la souris. Au cours du transport de sulfate dans l'AE1 sauvage, un proton est fourni par le glutamate 681 au sulfate. Ce transport peut avoir lieu dans les deux directions entrante et sortante, ce qui implique que le glutamate 681 est alternativement accessible au milieu intracellulaire et extracellulaire.

L'AE1 est d'abord décrit comme un échangeur chlorure/bicarbonate, mais selon les anions présents dans le milieu il s'est avéré qu'il pouvait prendre en charge d'autres espèces : nitrate, bromure, méthanoate hydrosulfure, fluorure, phosphite, methanophosphate, oxalate, iodure, glyoxalate, glycolate, acétate, sulfate, thiocyanate et phosphate (Sterling et al., 2001, Jennings, 2013). L'échange chlorure/bicarbonate reste cependant majoritaire dans l'organisme en raison

de l'abondance de bicarbonate dans les tissus d'expression de l'AE1 et de l'efficacité de l'échange nettement en faveur du bicarbonate et du chlorure par rapport aux autres ions (figure 11).

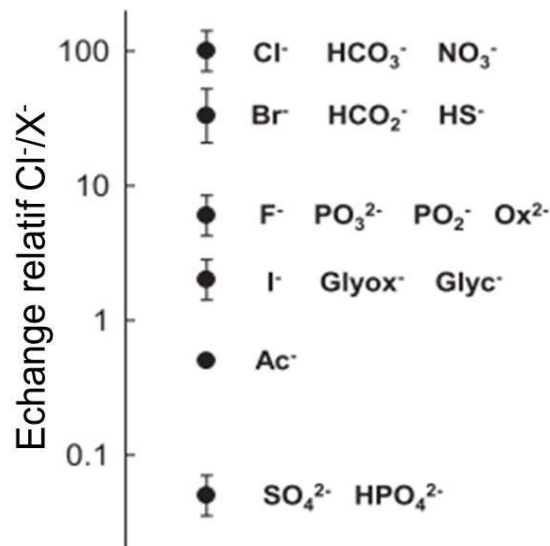


Figure 11. Taux d'échange relatif chlorure/anion via l'AE1.

Figure tirée de l'article de Jennings ML. Am J Physiol Cell Physiol 2013, « Figure7 : Relative Cl⁻/X⁻ exchange rate for various inorganic and organic anions via mammalian AE1 » (Jennings, 2013).

Comparaison entre les différents ions passant par l'AE1 lors d'un échange chlorure/anion avec les ions suivants : Cl⁻ (chlorure), HCO₃⁻ (bicarbonate), NO₃⁻ (nitrate), Br⁻ (bromure), HCO₂⁻ (méthanoate), HS⁻ (hydrosulfure), F⁻ (fluorure), PO₃²⁻ (phosphite), PO₂⁻ (methanophosphate), Ox²⁻ (oxalate), I⁻ (iodure), Glyox⁻ (glyoxalate), Glyc⁻ (glycolate), Ac⁻ (acétate), SO₄²⁻ (sulfate), HPO₄²⁻ (phosphate).

Dans certaines conditions extrêmes (concentration intracellulaire en chlorure faible, basse température, dépolarisation importante des cellules) deux ions chlorures pourraient être échangés contre un seul bicarbonate (Janas *et al.*, 1989).

L'AE1 participe à deux fonctions essentielles du corps humain : la respiration et la fonction rénale.

Dans les poumons, lorsque la pression partielle en dioxyde de carbone (p_{CO_2}) est faible l'AE1 fait entrer du bicarbonate dans le globule rouge où il est converti en CO_2 , grâce à l'intervention de l'Anhydrase Carbonique (CAII), puis relargué dans l'air expiré. Dans les muscles, où la pression partielle en CO_2 est élevée, le CO_2 diffuse dans les globules rouges où il est converti en bicarbonate par la CAII. Ce bicarbonate intracellulaire est échangé contre du chlorure extracellulaire par l'AE1. Ce système d'échange tire l'équilibre CO_2/HCO_3^- vers la production de bicarbonate et permet ainsi d'augmenter considérablement la capacité de transport du CO_2 par les globules rouges. Ce va-et-vient de bicarbonate par l'AE1 dans le globule rouge est essentiel au phénomène de respiration. Il permet de réguler la concentration du couple CO_2/HCO_3^- , un des tampons cellulaires majeur de l'organisme, et de maximiser le transport de carbone converti en bicarbonate des muscles vers les poumons (figure 12).

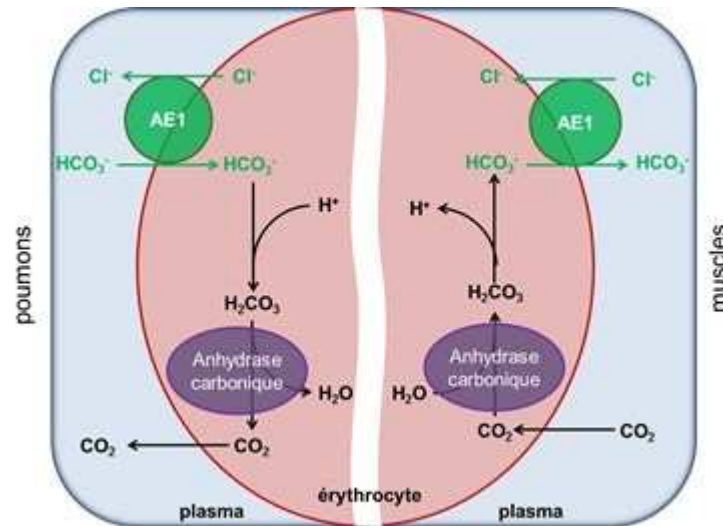


Figure 12. Fonctionnement de l'AE1 dans le globule rouge.

Dans les erythrocytes, l'AE1 et l'anhydrase carbonique II fonctionnent de pair et permettent de maximiser les échanges de carbone entre le cytoplasme et le plasma. Le passage des carbone peut s'effectuer dans les deux sens car le fonctionnement de ces deux protéines est réversible : il ne depend que la pression partielle en CO_2 (pCO_2) du milieu dans lequel il se trouve le globule rouge.

Dans le rein, son action est couplée avec 3 autres protéines avec lesquelles l'AE1 participe à la réabsorption de potassium, d'eau et de bicarbonate (figure 13). Cette réabsorption de bicarbonate permet à l'organisme d'éviter les acidoses systémiques.

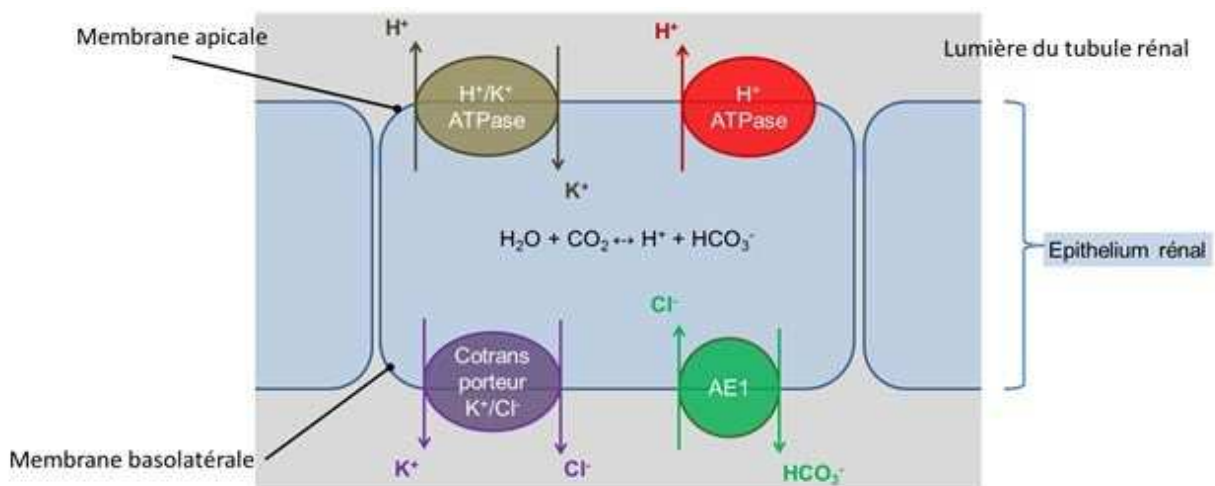


Figure 13. Schéma fonctionnel de l'AE1 dans une cellule α -intercalaire du rein.

Dans ce schéma fonctionnel les quatre protéines représentées fonctionnent en quatuor. Il en résulte un flux net de potassium de la lumière du tubule rénal vers l'organisme ainsi qu'une réabsorption d'eau.

1.1.1.1.5 Modulateurs de l'AE1.

Une des manières efficaces pour comprendre le fonctionnement d'une protéine est d'essayer de moduler sa fonction.

Un grand nombre de publications étudiant des effets sur la fonction des canaux, des pompes ou des échangeurs d'ions mettent en avant des modulateurs pouvant mimer ou compenser d'éventuelles mutations liées à des pathologies ou des phénotypes bien particuliers. Identifier les modes d'action de ces modulateurs est une bonne source d'information pour mieux comprendre la structure et le fonctionnement des protéines qu'ils modulent.

Un nombre important de composés sont utilisés pour moduler les échangeurs de la famille SLC4 (figure 14). L'inconvénient majeur de ces composés est qu'ils ne sont pas spécifiques pour une protéine particulière de la famille et que la majorité d'entre eux ont des effets sur un grand nombre de protéines membranaires autres que les SLC4. Aucun modulateur spécifique des échangeurs chlorure/bicarbonate, encore moins de l'AE1 uniquement, n'a été identifié.

L'utilisation des modulateurs des SLC4 sur des lignées de cellules donne des résultats souvent délicats à interpréter. En effet, sauf dans le cas où une protéine serait largement surexprimée par rapport à l'ensemble des autres protéines de la cellule, les effets constatés dus à l'utilisation de ces composés pourraient être un effet global sur la cellule.

1.1.1.1.5.1 Le gluconate de potassium.

Le gluconate de potassium est utilisé dans les expériences de laboratoire pour inhiber l'échange d'anions, de manière compétitive avec les anions extracellulaires. Dissous dans un milieu aqueux le gluconate prend la place de l'anion au niveau du site de transport et bloque l'échange par encombrement stérique. Le gluconate n'est pas spécifique de l'AE1 et peut potentiellement bloquer tous les transporteurs ou canaux prenant en charge des anions.

1.1.1.1.5.2 Les stilbènes disulfonates.

Le H₂DIDS (acide 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonique) peut se fixer de deux manières sur l'AE1 : de manière réversible ou de façon covalente en se fixant sur les lysines K539 et K850. En jouant sur le pH, le H₂DIDS peut se fixer à chacune de ces lysines et ainsi former un pont entre elles. La fixation covalente de H₂DIDS sur l'une ou l'autre des lysines ou sur les deux simultanément bloque l'activité d'échange anionique de l'AE1. Cet inhibiteur a été utilisé pour cibler l'AE1 dans diverses expériences (biochimie ou cinétique).

Dans la famille SLC4, l'AE2, l'AE3 et le NDAE1 sont aussi sensibles au H₂DIDS. Le H₂DIDS inhibe également les échanges d'ions de certaines protéines de la famille des SLC26.

Le H₂DIDS n'est pas la seule molécule qui permet de moduler les échangeurs anioniques. D'autres stilbènes disulfonates tels le SITS (acide 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonique) ou le DNDS (acide 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonique) par exemple

inhibent aussi l'échange chlorure/bicarbonate avec plus ou moins d'efficacité (Janas *et al.*, 1989, Janas, 2000, Janas, 2011).

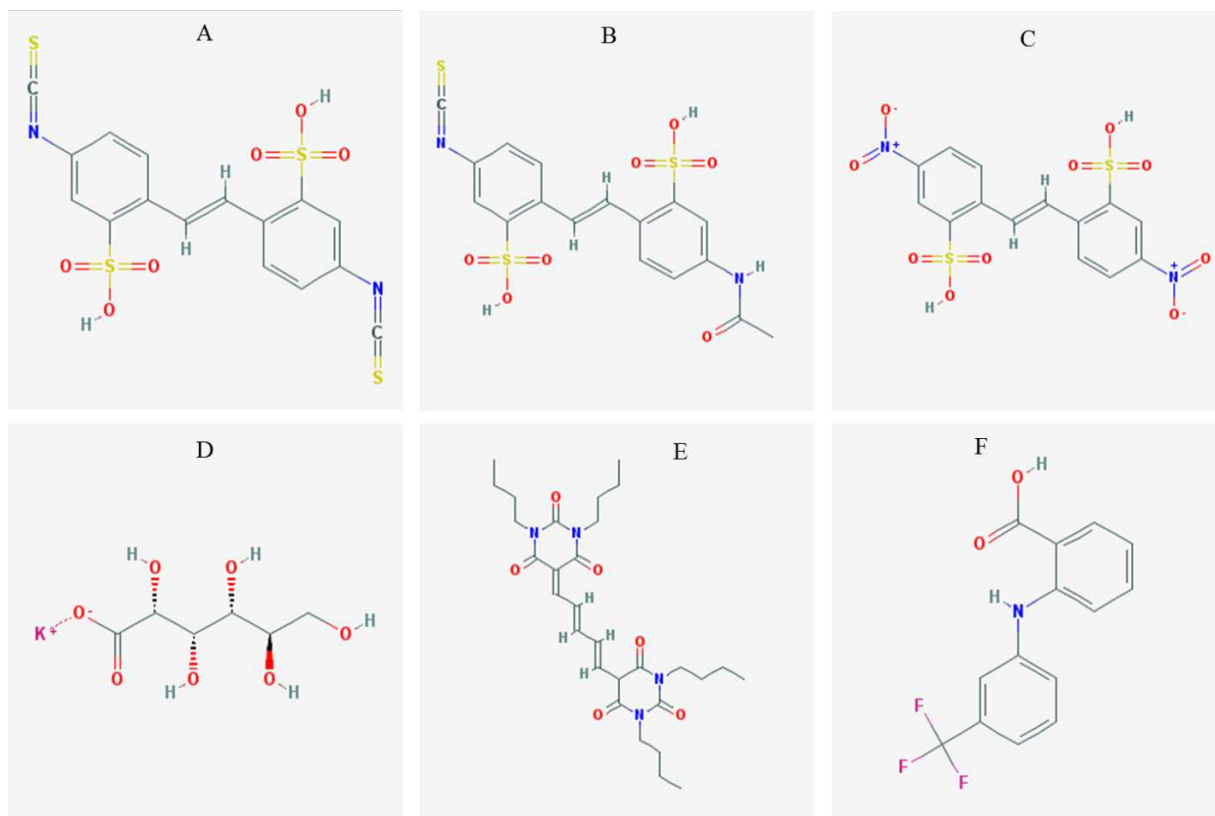


Figure 14. Quelques composés couramment utilisés comme modulateurs des *Slc4* dans la littérature.

- (A) H₂DIDS, acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique.
 (B) SITS, acide 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique.
 (C) DNDS, acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique.
 (D) Potassium Gluconate.
 (E) diBa, bis(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol.
 (F) Acide flufenamique.

Formules topologiques des molécules tirées de « PubChem Compound » (www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound).

1.1.1.1.5.3 Autres classes de composés.

D'autres classes de composés peuvent avoir des effets inhibiteurs du transport d'anions avec plus ou moins d'efficacité.

Les Oxonols sont des colorants cellulaires sensibles au voltage qui sont connus pour inhiber certains canaux chlorure. Le bis(1,3-dibutylbarbituric acide)pentamethine oxonol (diBA) fait partie de cette catégorie de composés. Le diBA peut inhiber l'échange chlorure/bicarbonate de l'AE1 avec une constante d'inhibition K_i proche de 1nM (Knauf *et al.*, 1995). Selon Knauf, le diBa serait donc le composé le plus efficace pour inhiber l'échange chlorure/bicarbonate dans l'AE1 bien devant les composés classiquement utilisés comme le DIDS ou les autres stilbènes disulfonates.

Certains polyamineostérols, comme les squalamines inhibent l'AE1 et l'AE2 avec des constantes d'inhibition de l'ordre du micromolaire (Alper *et al.*, 1998).

L'acide flufénamique bloque l'échange chlorure/bicarbonate des SLC4 via leur côté intracellulaire (Knauf *et al.*, 1996). Mais ce composé est aussi un bloqueur connu des canaux calciques voltage-dépendants (Lovering *et al.*, 2004).

Enfin, des anticorps dirigés contre différentes parties extracellulaires des échangeurs chlorure/bicarbonate ont été utilisés plus récemment, sur l'AE3 notamment (Cingolani *et al.*, 2003). Cette démarche a été développée pour inhiber spécifiquement l'échange chlorure/bicarbonate des deux isoformes de l'AE3 (AE3c et AE3fl) pour étudier l'influence des variations du pH intracellulaire des cellules cardiaques lors d'expériences nécessitant la perfusion des cellules cardiaques dans un milieu tamponné au bicarbonate.

On peut donc supposer qu'une démarche similaire puisse être développée pour les autres membres des échangeurs anioniques dont l'AE1.

De manière indirecte nous pouvons aussi inhiber l'AE1 en le privant de substrat par exemple en ciblant l'Anhydrase Carbonique II (CAII), principal partenaire fonctionnel de l'AE1 dans le globule rouge. L'anhydrase carbonique produit du bicarbonate à partir d'eau et de dioxyde de carbone (Sterling *et al.*, 2001) et peut être inhibée spécifiquement par l'ethoxzolamide par exemple (Maren, 1967). En ciblant la zone d'interaction entre l'AE1 et la CAII, située au niveau de la zone C-terminale de l'AE1, Sowah et Casey ont montré qu'on pouvait diminuer l'efficacité de l'échange chlorure/bicarbonate par l'AE1 (Sowah *et al.*, 2011).

1.1.1.1.6 Maladies humaines liées au SLC4A1.

Il existe plusieurs maladies humaines liées directement à l'AE1. Elles concernent les reins et les érythrocytes qui sont les lieux principaux d'expression de l'AE1. L'étude de ces pathologies apporte beaucoup d'informations sur la structure et le mode de fonctionnement de l'AE1. Les observations cliniques et les études qui ont été menées permettent notamment de mettre en avant des structures clé dans la protéine en identifiant des acides aminés essentiels à l'échange chlorure/bicarbonate ou à son adressage correct à la membrane plasmique voire à ses interactions avec d'autres protéines partenaires.

Une altération de l'adressage, de l'échange chlorure/bicarbonate ou des modifications des interactions avec l'environnement protéique de l'AE1 conduit généralement à l'apparition de pathologies.

Néanmoins, les mutations causant à la fois des maladies rénales et érythrocytaires sont rares car les causes sont généralement différentes. Dans le globule rouge, la présence de la GPA

(« Glycophorine A ») qui agit comme une protéine chaperonne de l'AE1 peut compenser les effets des mutations liées à la dRTA (Young *et al.*, 2003).

1.1.1.1.6.1 Maladie rénale : l'acidose du tubule rénal distal (dRTA)

La dRTA (« distal renal tubular acidosis ») est une acidose, c'est-à-dire une diminution anormale du pH dans l'organisme. Cette maladie se caractérise par une forte diminution voire une absence de sécrétion d'ions H^+ vers les urines au niveau des cellules alpha-intercalaires du canal collecteur cortical. Les ions H^+ se concentrent alors dans les cellules et le sang d'où l'acidose. Elle s'accompagne en général d'une diminution de la réabsorption de potassium par le rein causant la formation de calculs rénaux accompagnés par une hypokaliémie.

Dans les cellules alpha intercalaires du rein, l'AE1 est exprimé au niveau de la membrane basolatérale et fonctionne en tandem avec le cotransporteur chlorure/potassium (figure 13) : le chlorure réabsorbé par l'AE1 sert de substrat au cotransporteur chlorure/potassium. Au niveau fonctionnel, une diminution de la réabsorption de chlorure via l'AE1 provoque une diminution du passage du potassium des urines vers le sang, une augmentation de la concentration en potassium dans les urines et une baisse de la concentration de potassium dans le sang, autrement dit l'hypokaliémie sanguine caractéristique de la dRTA et une hyperkaliurie impliquée dans la formation de calculs rénaux.

Les mutations de l'AE1 les plus courantes associées à la dRTA sont R589H/S/C, R602H, G609R, S613F, G701D, Q759, S773P, S799, Δ V850, A858D et Δ 901-911 (Bruce *et al.*, 1997, Karet *et al.*, 1998, Tanphaichitr *et al.*, 1998, Bruce *et al.*, 2000, Sritippayawan *et al.*, 2003, Kittanakom *et al.*, 2004).

La dRTA peut être dominante ou récessive. Dans le cas où la mutation dRTA est dominante, l'AE1 n'est simplement pas exprimé à la membrane plasmique et retenu dans le réticulum endoplasmique des cellules rénales (Jarolim *et al.*, 1998, Kittanakom *et al.*, 2004) ou le mutant, mal adressé à la membrane plasmique, est exprimé conjointement à la membrane apicale et basolatérale de la cellule (Devonald *et al.*, 2003, Rungroj *et al.*, 2004, Toye *et al.*, 2004). C'est le cas du mutant Δ 901-911 par exemple.

Les mutants récessifs tels G701D sont présents à la membrane plasmique mais la cellule présente une forte diminution de l'échange chlorure/bicarbonate.

La principale différence avec les mutations dominantes est la capacité de la protéine issue du gène portant la mutation récessive de former des polymères avec de l'AE1 sauvage qui soient correctement adressés vers la membrane basale.

Que la mutation soit récessive ou dominante, l'apparition des symptômes est liée à un défaut de substrat dans la cellule pour les quatre protéines (figure 13) :

- Le maintien d'un gradient de chlorure entre le sang et la cellule rénale nécessaire au fonctionnement du cotransporteur chlorure/potassium. Privé d'un gradient de chlorure suffisant le cotransporteur chlorure/potassium ne peut plus faire passer du potassium vers le sang et la cellule rénale est saturée en potassium.
- Ce phénomène impacte dans un second temps la H^+/K^+ -ATPase situé sur la membrane apicale de la cellule qui ne peut plus excréter des ions H^+ vers les urines pour capturer du potassium.
- L'évacuation du bicarbonate créé par la réaction $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ n'étant plus assurée par l'AE1, le bicarbonate devient saturant dans la cellule et la réaction s'arrête une fois à l'équilibre : la production des ions H^+ par la réaction cesse.

Il a de plus été montré que certains mutants étaient capables de former une conductance cationique permettant la dissipation du gradient de sodium et de potassium. Surexprimés dans l'ovocyte de xénope, les mutants G701D, R589H, G609R et S613F sont présents à la membrane plasmique où, en parallèle de leur activité standard d'échange chlorure/bicarbonate, ils induisent une légère fuite de potassium et de sodium (Walsh *et al.*, 2008).

1.1.1.1.6.2 Maladies érythrocytaires.

Les maladies humaines liées à des mutations sur l'AE1 sont des anémies hémolytiques héréditaires. Il s'agit de maladies qui se caractérisent par une fragilité des érythrocytes qui ont tendance à éclater lorsqu'ils sont soumis à des variations physico-chimiques de leur environnement. Les anémies hémolytiques liées à l'AE1 ont été classées en catégories selon l'aspect que prenaient les globules rouges : les stomatocytoses, l'ovalocytose du sud-est asiatique, certains cas de sphérocytoses et d'acanthocytoses (figure 15).

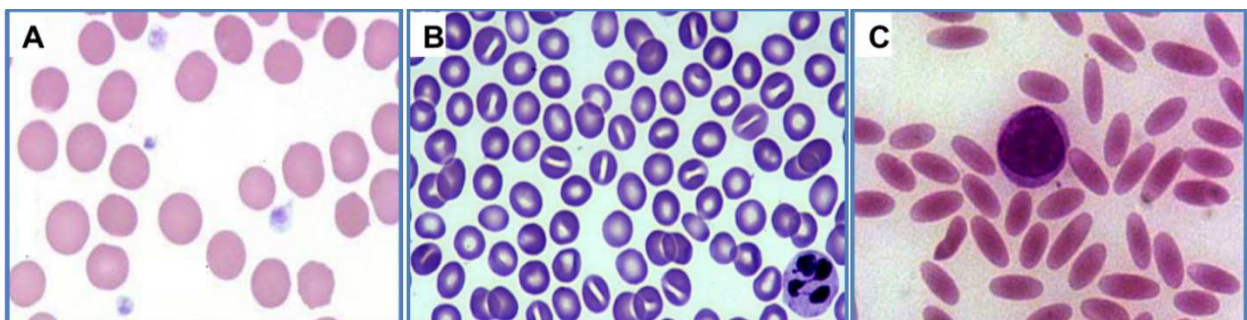


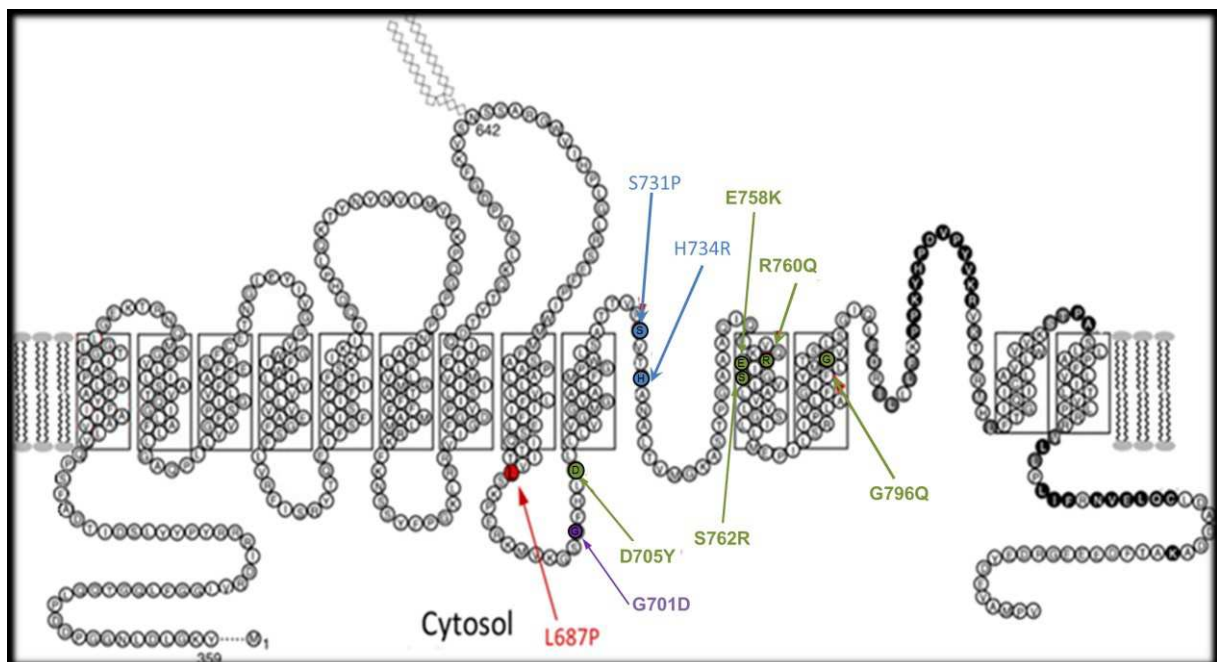
Figure 15. Dysfonctionnements de la protéine associés à des pathologies érythrocytaires chez l'homme.

Altération de l'adressage de l'AE1: Sphérocytose (A)
Modification du fonctionnement de l'AE1: Stomatocytose (B), Ovalocytose (C).

1.1.1.1.6.2.1 Stomatocytoses

1.1.1.1.6.2.1.1 La stomatocytose héréditaire (HsT).

Ces érythrocytes se distinguent des érythrocytes normaux par une forme en stomate caractéristique (figure 15B). Les stomatocytoses se caractérisent par des globules rouges ayant une perméabilité cationique anormalement élevée, insensible à l'ouabaine ou au bumétanide et augmentée par le froid. Dans le cas des stomatocytoses héréditaires liées à l'AE1, des mutations ponctuelles dans la partie membranaire de la protéine sont responsables de cette pathologie. Ces mutations, modifient les propriétés de transport de la protéine qui devient perméable au sodium et au potassium. Selon la mutation, l'AE1 conserve ou non ses propriétés d'échange anionique à un niveau plus ou moins important. Un autre point commun de ces mutations ponctuelles est que les protéines mutées deviennent insensibles aux inhibiteurs utilisés couramment pour bloquer l'échange chlorure/bicarbonate de l'AE1 tels le DIDS par exemple. Cependant les protéines mutées restent détectables à la membrane des érythrocytes ce qui suggère que ces mutations n'influent pas sur l'adressage des protéines à la membrane plasmique.



Topologie de la partie membranaire de l'AE1 d'après Q. Zhu, 2003 (Zhu *et al.*, 2003). En couleur ont été rajoutées des mutations ponctuelles naturelles identifiées chez des patients atteints de stomatocytoses héréditaires classées ci-après.

Cliniquement ces stomatocytoses liées à l'AE1 sont assez bien décrites et correspondent à des phénotypes érythrocytaires différents qui dépendent, notamment, de l'importance de la fuite de cations et la sévérité de la maladie (Stewart, 2004).

Mutations S731P et H734R dans l'AE1.

Ces mutations sont associées à un phénotype de cryohydrocytose (CHC) (figure 16, mutations en **bleu**). Ce phénotype se caractérise par une fuite de cations moyenne dans les globules rouges à 37°C qui augmente de manière significative à basse température (Stewart, 2004). Ces deux mutations ponctuelles convertissent l'échangeur anionique en voie de conductance pour le sodium et le potassium (Bruce *et al.*, 2005, Guizouarn *et al.*, 2007).

Mutation L687P ou « Blackburn ».

La mutation ponctuelle L687P se caractérise par une fuite de cations modérée, plus faible que dans le cas des CHC (figure 16, mutation en **rouge**) (Stewart, 2004, Bruce *et al.*, 2005, Guizouarn *et al.*, 2007).

Mutations R760Q, D705Y, G796R, S762R et E758K.

Ces mutations sont associées à une fuite de cations modérée augmentant à basse température similaire à la fuite détectée dans le cas de la Cryohydrocytose (figure 16, mutations en **vert**). Phénotypiquement les érythrocytes ont cependant une forme différente de ceux décrits pour la Cryohydrocytose : ils sont sphérocytiques (Bruce *et al.*, 2005). Ces deux mutations font apparaître une conductance cationique dans l'AE1 mais R760Q conserve également la capacité d'échange anionique au contraire de la mutation D705Y qui comme les précédentes ne peut plus transporter les anions (Bruce *et al.*, 2005, Guizouarn *et al.*, 2007, Ellory *et al.*, 2009).

D'autres mutations ponctuelles dans l'AE1 ont pu être rajoutées à cette catégorie, il s'agit des mutations G796R, S762R et E758K (Barneaud-Rocca *et al.*, 2011b).

Le phénotype G796R est beaucoup plus sévère que celui correspondant aux deux autres mutations de base (R760Q et D705Y).

1.1.1.1.6.2.1.2 L'ovalocytose de l'Asie du Sud-Est (« Southeast Asian Ovalocytosis » ou SAO).

Il s'agit d'une stomatocytose signalée pour la première fois en Malaisie sur des aborigènes dès 1965 (Lie-Injo LE., 1965) mais elle n'a été liée à l'AE1 que plus récemment (Jarolim *et al.*, 1994). Il y a des références antérieures qui montrent que l'AE1 SAO n'est pas fonctionnelle

(Schofield *et al.*, 1992). Cette pathologie est connue pour conférer une certaine résistance aux formes graves de paludisme (Kidson *et al.*, 1981, Hadley *et al.*, 1983).

Les globules rouges prennent une forme plus ovale que les érythrocytes standards (figure 15C).

Les principaux phénotypes liés à cette pathologie sont des effets sur les globules rouges. Nous pouvons noter une réduction de la sensibilité cellulaire à la variation de pression osmotique, une réduction de la sensibilité au changement de température et une plus grande rigidité membranaire. Cette rigidité membranaire rend le globule rouge moins déformable lors du passage au niveau de fins capillaires sanguins et tend à provoquer une lyse du globule rouge lors de contraintes physiques.

Il a aussi été montré que le globule rouge SAO avait un échange d'anions réduit, un niveau plus bas d'ATP, une dissipation du gradient de Na^+ et K^+ stimulée par le froid et une réduction de l'expression des certains antigènes.

Au niveau protéique, la SAO se caractérise par une délétion sur la protéine AE1 d'une dizaine d'acides aminés à la limite entre les domaines intracellulaire et membranaire de la protéine. La séquence de délétion s'étend de l'Alanine 400 à l'Alanine 408 (figure 9). L'impact sur la protéine est probablement une déformation de la partie membranaire et un réarrangement de la partie N-terminale modifiant les liaisons des partenaires de l'AE1 et ses propriétés de transport. On observe une disparition de l'échange normal chlorure/bicarbonate et l'apparition d'une voie de conductance pour le sodium et le potassium (Guizouarn *et al.*, 2011). Après cette étude il a été proposé que la SAO soit une forme de stomatocytose héréditaire et pas une autre catégorie de maladie érythrocytaire. Les modifications de la partie N-terminale changent les interactions cellulaires de l'AE1, ce qui modifie de manière significative l'aspect des globules rouge à cause des liens de l'AE1 avec le cytosquelette. Nous l'avons vu précédemment (figure 7), l'AE1 fait partie d'un important réseau protéique incluant l'ankyrine et d'autre protéines telles que la protéine 4.2, le CD47, RhAG, etc. Des études plus récentes proposent que cette délétion affecte l'association de la protéine en tétramère au niveau membranaire des érythrocytes, amplifiant encore le phénomène.

Dans les globules rouges, la liaison entre la GPA (glycophorine A) et l'AE1 force la montée à la membrane d'AE1 mal repliées responsables de la pathologie. Dans le rein en revanche, la meilleure régulation et l'absence de GPA ne permet pas l'expression des AE1 pathologiques.

1.1.1.1.6.2.2 Sphérocytose héréditaire (HS).

Cette pathologie baptisée à l'origine Minkowski-Chauffard est la pathologie responsable du plus grand nombre d'anémies hémolytiques en France (Delaunay *et al.*, 1995). Elle est due à l'absence (ou au mauvais adressage) ou à une malformation d'une ou de plusieurs protéines du cytosquelette du globule rouge. Cela inclut la spectrine, l'ankyrine, l'AE1 (dans 20 à 35% des cas) ou la protéine 4.2 (Perrotta *et al.*, 2008) Ce défaut du cytosquelette rend les globules rouges sphériques et moins flexibles.

Il existe 5 types de sphérocytoses héréditaires, classées selon le gène touché (tableau B).

Tableau B. Différents types de sphérocytoses héréditaires

Type	Protéine, gène impliqué	Locus génétique
HS1	Ankyrine 1, <i>ANK1</i>	8p11.2
HS2	Spectrine chaîne β , <i>SPTB</i>	14q22-q23
HS3	Spectrine chaîne α , <i>SPTA1</i>	1q21
HS4	AE1, <i>SLC4A1</i>	17q21-q22
HS5	Protéine 4.2, <i>EPB42</i>	15q15

Les sphérocytes ont une surface membranaire, donc une surface d'échange, moins importante que les globules normaux ce qui a pour conséquence de réduire leurs capacités d'échange d'oxygène et de CO₂. Ces globules rouges ont aussi une fragilité osmotique supérieure à la normale et sont plus sensibles aux dégradations physiques causant le principal symptôme de la maladie : l'anémie hémolytique.

Les sphérocytoses de type 4 sont la cause principale d'anémies hémolytiques héréditaires dues à des mutations sur l'AE1.

Une des premières mutations de l'AE1 identifiées est la mutation P327R située dans le domaine cytoplasmique de l'AE1 (Jarolim *et al.*, 1991). Par la suite un plus grand nombre de mutations ont été liées à l'AE1 (figure 9). Dans tous les cas, les mutations de l'AE1 associées à une sphérocytose empêchent son adressage à la membrane plasmique et sont donc associées à une diminution de bande 3 dans la membrane érythrocytaire. La fonction de transport de la protéine ne serait pas affectée contrairement à ce que nous venons de voir pour les stomatocytoses.

1.1.1.1.6.2.3 Acanthocytose.

L'acanthocytose est une condition dans laquelle les érythrocytes ont des projections en forme d'épines (Kay *et al.*, 1988). Il a été rapporté que des malades présentant ce phénotype particulier avaient une mutation spécifique de l'AE1 (Bruce *et al.*, 1993). Cette mutation se situe

dans le domaine transmembranaire de la bande 3, il s'agit de la mutation ponctuelle P868L. D'après LJ. Bruce, cette mutation affecte les propriétés de transport de la bande 3 en augmentant ses capacités de transport. On observe une augmentation de la vitesse maximale (V_{max}) de passage des anions par la protéine. Ce phénotype a été appelé Bande 3 HT pour « High Transport ». Cette mutation ponctuelle modifie aussi les propriétés de fixation du DIDS sur le motif $_{539}\text{KLIK}_{542}$, suggérant une modification de l'agencement membranaire de la protéine selon les auteurs. Il n'y a pas de preuve évidente que cette mutation affecte directement la liaison de l'AE1 au cytosquelette par sa partie N-terminale. Nous l'avons vu, les fonctions enzymatiques et structurelles de la bande 3 sont indépendantes au sein de la protéine. En revanche, les auteurs avancent que cette mutation pourrait diminuer le degré d'association de l'AE1 en tétramère ce qui pourrait influencer la qualité et la quantité de domaines protéiques complets (c'est-à-dire comportant quatre AE1).

1.1.1.1.6.2.4 Pré-éclampsie

Des mutations ponctuelles dans le gène de l'AE1 ont été récemment liées à la pré-éclampsie dans une étude clinique de 2010 (Morrison *et al.*, 2010). Cette pathologie se caractérise par une pression sanguine élevée et une protéinurie importante.

Certains patients de cette étude avaient des mutations dans le gène de l'AE1, très majoritairement dans des introns, à l'exception d'une mutation localisée dans la partie 5' UTR du gène.

Le lien entre cette pathologie et les fonctionnalités de la protéine AE1 n'est pas évident : si la corrélation semble correcte au niveau génétique, l'impact de ces mutations sur la protéine n'a cependant pas été évalué par les auteurs.

Les principaux phénotypes caractéristiques de la maladie se manifestent dans les lieux d'expression de l'AE1. Les mutations mises en cause dans l'AE1 pourraient avoir un impact dans la régulation de la production de l'AE1. Dans le rein la production d'AE1 est régulée plus finement que dans les érythrocytes, on peut donc supposer que l'impact majoritaire de ces mutations sera plus important dans le rein, ce qui reste compatible avec les phénotypes observés sur les patients.

1.1.1.2 SLC4A2.

Le gène *SLC4A2* code pour la protéine AE2. *SLC26A2* a été identifié pour la première fois en 1988 par Alper chez la souris (Alper *et al.*, 1998) Ce n'est que plus tard en 1997 que Medina l'a cloné chez l'humain (Medina *et al.*, 1997).

A la différence de l'AE1, l'AE2 a une expression plus ubiquitaire. Il agirait ainsi comme un régulateur général de la concentration de base en bicarbonate dans les cellules. L'AE2 est essentiel à plusieurs processus biologiques notamment au transport de bicarbonate au niveau du tractus gastro-intestinal (Gawenis *et al.*, 2010) et participe au bon fonctionnement des ostéoclastes (Wu *et al.*, 2008).

Chez l'homme, l'AE2 existe sous plusieurs formes issues d'épissages alternatifs (Wang *et al.*, 1996). Ainsi, nous pouvons lister les formes *a*, *b1*, *b2* et *c*. Ces quatre formes de l'AE2 ont un fonctionnement identique mais se différencient par des lieux d'expression différents. La forme *a* est exprimée partout dans l'organisme à un niveau relativement bas. Les deux formes *b1* et *b2* sont plus spécifiquement exprimées au niveau des hépatocytes (où elles participent à la sécrétion canaliculaire de bicarbonate dans la bile) et dans les cellules épithéliales (Medina *et al.*, 1997). Enfin la forme *c* s'exprime préférentiellement dans l'estomac (Wang *et al.*, 1996). Dans l'estomac, son rôle est de contrebalancer l'alcalinisation des cellules gastriques provoquée par l'excrétion de proton vers l'estomac par la pompe H^+/K^+ ATPase (Muallem *et al.*, 1988).

L'AE2 échange du chlorure contre du bicarbonate avec une stœchiométrie de 1 pour 1. L'AE2 est sensible au pH intracellulaire (Stewart *et al.*, 2002). La littérature propose la séquence ³³⁸WRETARWIKFEE₃₄₉ située dans le domaine N-terminal de l'AE2 comme senseur et régulateur de cette réponse au pH. Cette séquence est présente chez l'AE1, l'AE2 et l'AE3 mais dans l'AE1 cette séquence est moins bien conservée et n'est pas située à la même position dans la séquence d'acides aminés de la protéine (figure 17). Ceci pourrait expliquer que l'AE2 et l'AE3 soient sensibles au pH et pas l'AE1. L'AE2 est plus actif à pH_{intracellulaire} légèrement alcalin et son activité diminue à pH_{intracellulaire} acide. A pH physiologique, son activité se situe aux alentours de 60% de son activité maximale (Sterling *et al.*, 1999).

Séquence pH sensible	1	-----WRETARWIKFEE-----	12
AE3 (sp P48751 B3A3_HUMAN)	318	PHEVFVELNELMLD-RSQEPHWRETARWIKFEEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLLELRRTIAHGAALLDLEQTTLPGIAHLVV	400
AE2 (sp P04920 B3A2_HUMAN)	320	PHEVFVELNELLD-KNQEPQWRETARWIKFEEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLLELRRTLAHGAVLLDDIQQTLPQVAHQVV	402
AE1 (sp P02730 B3AT_HUMAN)	54	THKVYVELQELVMDEKNQELRWMEARWVQLEENLGEN-GAWGRPHLSHLTWSLLELRRTVFTKCTVLLDLQETSACVANQLL	136

Figure 17. Alignement des séquences de l'AE3, de l'AE2 et de l'AE1 avec la séquence sensible au pH.

Les séquences des trois protéines ont été récupérées sur UniProt (www.uniprot.org) et alignées avec la séquence pH sensible grâce à Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ et www.clustal.org/) (Goujon *et al.*, 2010, Sievers *et al.*, 2011). Les séquences utilisées sont les séquences protéiques de l'AE1e s'exprimant dans les érythrocytes, de la forme « a » de l'AE2 et de la forme « fl » de l'AE3. Sont représentés en rouge les acides aminés différents entre l'AE3 et les 2 autres échangeurs.

Une autre séquence appartenant à une boucle de l'AE2 a aussi été plus récemment impliquée dans la sensibilité au pH de l'AE2 (Stewart *et al.*, 2009). Les acides aminés ¹⁰⁷⁵DKPK¹⁰⁷⁸ ne sont pas conservés dans la séquence de l'AE1 et de l'AE3. Cela permet d'expliquer les différentes sensibilités au pH entre AE2 et AE3 bien que les deux protéines possèdent la première séquence WRETARWIKFEE mise en évidence dans leur partie N-terminale. Stewart a montré notamment que séparément ces deux séquences sensibles au pH ne suffisaient pas à récupérer une sensibilité au pH similaire à celle de l'AE2 lorsqu'on les plaçait dans l'AE1. Par contre replacées dans une chimère AE2₍₁₋₉₂₀₎/AE1₍₆₁₃₋₉₁₁₎ contenant les deux séquences on pouvait retrouver une sensibilité au pH identique à celle de l'AE2.

La séquence d'acides aminés de l'AE2 est identique à près de 55% à celle de l'AE1 (Romero *et al.*, 2004). Si on ne regarde que la partie membranaire, C-terminale hydrophobe, de la protéine, l'AE2 et l'AE1 ont 64% d'identité chez l'homme (Kudrycki *et al.*, 1990).

1.1.1.3 SLC4A3.

Le gène *SLC4A3* code pour la protéine AE3. Cette protéine effectue un échange chlorure/bicarbonate. L'AE3 existe sous plusieurs isoformes : AE3fl (pour « full-length ») et AE3c (pour « cardiac ») elles se différencient par leur promoteur et au niveau de leur région N-terminale où 270 acides aminés de l'AE3fl sont remplacés par un groupe de 73 acides aminés dans l'AE3c (Kopito *et al.*, 1989, Kudrycki *et al.*, 1990, Linn *et al.*, 1992, Yannoukakos *et al.*, 1994). L'AE3 s'exprime surtout dans les cellules excitables de l'organisme : dans le cerveau, la rétine, le cœur, le muscle lisse, et certaines cellules épithéliales du rein et du tractus gastro-intestinal (Kopito *et al.*, 1989, Linn *et al.*, 1992, Kobayashi *et al.*, 1994, Brosius *et al.*, 1997). Comme l'AE2, l'AE3 est sensible au pH (Stewart *et al.*, 2009). En revanche l'AE3 ne semble pas sensible au pH intracellulaire en dehors de la fourchette de 6,0 < pH_i < 9,0 et serait stimulé lors d'une augmentation de pH_i (Sterling *et al.*, 1999, Stewart *et al.*, 2002).

La séquence d'acides aminés de l'AE3 est identique à près de 53% de celle de l'AE1 et 56% de l'AE2 chez l'homme (Romero *et al.*, 2004), avec la partie C-terminale hydrophobe de la protéine AE3 à 69% d'identité avec l'AE1 (Kudrycki *et al.*, 1990).

Des mutations ponctuelles de cette protéine sont liées à des pathologies cérébrales chez la souris et chez l'homme (Hentschke *et al.*, 2006, Vilas *et al.*, 2009). L'étude de l'AE3 Ala867Asp dans ces deux organismes a permis de mettre en évidence l'AE3 comme acteur participant à la régulation du pH des cellules cérébrales, notamment des cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe, jouant un rôle lors de crises d'épilepsies.

1.1.2 Transporteurs de bicarbonate liés au sodium

Cette sous-famille des transporteurs de bicarbonate, à la différence des échangeurs anioniques, présente un transport dépendant du sodium. Le sodium est un substrat ou un simple modulateur. Les protéines regroupées au sein de cette famille ont en commun une séquence d'acides aminés similaire aux alentours de 50% d'identité en moyenne entre elles et d'environ 30-35% avec les échangeurs anioniques AE1, AE2 et AE3.

1.1.2.1 *SLC4A4*.

Le gène *SLC4A4* code pour la protéine NBCe1 (« NBC « pour Na⁺/Bicarbonate Cotransporteur et « e » pour électrogénique). Ce gène a été cloné chez le rat (Pushkin *et al.*, 2000) et chez l'homme assez récemment (Burnham *et al.*, 1997). La mise en évidence de cette protéine est cependant plus ancienne : grâce à des travaux sur la salamandre dès 1983 (Boron *et al.*, 1983). Cette protéine est produite chez l'homme en différents variants d'épissage selon son lieu d'expression. En effet, cette protéine se retrouve dans le tubule proximal du rein pour le variant d'épissage A, le pancréas, le cœur et l'œil pour le variant d'épissage B, et enfin le dans cerveau pour variant d'épissage C. Les variations de l'épissage se font à différents niveaux. Au niveau du promoteur pour la forme A rénale, dans ce cas la protéine se forme à partir d'un promoteur alternatif dans l'intron 3. Au niveau protéique cela se traduit par des variations au niveau N-terminal où 45 acides aminés de la forme A remplacent 85 acides animés de la forme B. La forme C est une variation issue de la forme B où 45 acides aminés en position C-terminale de la forme B sont remplacés par 65 autres acides animés sur la forme C.

NBCe1 transporte bicarbonate et sodium en utilisant une stœchiométrie de 1:2 ou 1:3 (un bicarbonate et plusieurs ions sodium) selon les études. Dans l'ovocyte de xénope, NBCe1 aurait une stœchiométrie de 1+2 si le milieu externe a une concentration en calcium inférieure à 100nM et 1+3 pour des concentrations en calcium supérieures à 500nM (Sciortino *et al.*, 1999). Dans des lignées humaines rénales la stœchiométrie pourrait varier selon le type de cellules : selon qu'il s'agisse d'une lignée rénale du tubule proximal ou du tubule collecteur la stœchiométrie serait respectivement de 1:2 et 1:3. Au final, NCBe1 aurait toujours un fonctionnement électrogénique mais légèrement variable selon son environnement.

1.1.2.2 SLC4A5.

Le gène *SLC4A5* code pour la protéine NBCe2. La protéine est exprimée majoritairement chez l'homme dans le foie et la rate. Elle effectue un symport électrogénique prenant en charge du bicarbonate et du sodium. Son mode de fonctionnement est similaire à celui de la protéine NBCe1 mais sa répartition dans l'organisme est différente. La séquence de la protéine est très similaire à celle NBCe1. Cela se traduit au niveau génétique par une identité de 53% entre les gènes *SLC4A4* et *SLC4A5* codant respectivement pour NBCe1 et NBCe2 (Romero *et al.*, 2004). En revanche le pourcentage d'identité avec l'AE1 est bien plus bas : 29%.

1.1.2.3 SLC4A7.

Le gène *SLC4A7* code pour la protéine NBC3 ou NBCn1 (« NBC « pour Na⁺/Bicarbonate Cotransporteur et « n » pour électroneutre). *SLC4A7* a été clonée en 1999 par Pushkin à partir de muscle humain (Pushkin *et al.*, 1999). NBCn1 s'exprime dans la rate, le cerveau, les poumons, le foie, le rein et les muscles.

1.1.2.4 SLC4A8.

SLC4A8 est un échangeur chlorure/bicarbonate électroneutre régulé par le sodium. *SLC4A8* est classiquement regroupé dans la même catégorie que les échangeurs *SLC4A7* et *SLC4A10* car *SLC4A8* a une séquence d'acides aminés très similaire : respectivement 72 et 76% d'identité chez l'homme (Romero *et al.*, 2004), bien que son fonctionnement soit différent. Le gène *SLC4A8* code pour la protéine NDCBE (« Na⁺-Dependant Chloride/Bicarbonate Exchanger »). Cette protéine est exprimée majoritairement dans le rein et les neurones (Russell *et al.*, 1976, Schwiening *et al.*, 1994).

NDCBE effectue un échange entre deux ions bicarbonate (HCO₃⁻) extracellulaires plus un sodium (Na⁺) extracellulaire contre un chlorure (Cl⁻) intracellulaire : nous pouvons donc parler d'échange électroneutre.

1.1.2.5 SLC4A10.

Le gène *SLC4A10* code pour la protéine NCBE (pour « Na⁺ driven Chloride/Bicarbonate Exchanger ») (Yano *et al.*, 2000). Cette protéine s'exprime principalement dans le cerveau (Wang *et al.*, 2000). Selon la littérature la protéine NCBE effectue un échange électroneutre chlorure/bicarbonate, régulé par le sodium. Lorsqu'on l'exprime dans l'ovocyte de xénope elle effectue un symport sodium/bicarbonate où la présence de chlore « n'est pas indispensable » (Romero *et al.*, 2004). La littérature a identifié deux variants d'épissage chez l'homme : NCBE-A et NCBE-B. Ces deux variants se différencient par la présence d'un exon supplémentaire de 30 acides aminés en position C-terminale dans la forme « B » (Wang *et al.*, 2000).

1.1.3 Les autres membres des SLC4.

Les deux derniers membres des SLC4 n'ont été inclus dans la famille que plus récemment suite à la publication et l'analyse des banques d'EST humains. Les EST (« Expressed Sequence Tag ») sont des collections de séquences génétiques « short single-read transcript » issues de GenBank, une banque de données regroupant les données de séquençage du génome humain. Ces séquences donnent des ressources pour évaluer l'expression de gènes et éventuellement la variation de l'expression de ces gènes dans différents tissus. C'est la comparaison des EST liées à ces deux gènes et des EST liées à la famille des SLC4 qui a permis leur rapprochement.

1.1.3.1 SLC4A9.

Récemment cloné le gène *SLC4A9* a une séquence similaire à celle des NBC (40 à 50% chez l'homme) (Romero *et al.*, 2004) et environ 30% de similitude avec les échangeurs d'anions 1-3 humains (Tsuganezawa *et al.*, 2001). Selon la littérature *SLC4A9* existe sous deux formes issues d'épissages alternatifs au niveau de sa partie N-terminale (Ko *et al.*, 2002). Son expression est principalement détectée dans le rein, au niveau apical des cellules β -intercalaires, et le cerveau au stade fœtal. Il possède une activité d'échange anionique, sodium-indépendante et insensible au H₂DIDS.

1.1.3.2 SLC4A11.

Le gène *SLC4A11* code pour la protéine BTR1 (« Bicarbonate-Transporter Related protein 1 »). Le gène *SLC4A11* a été identifié en 2001 (Parker *et al.*, 2001) mais n'a été lié à la famille des SLC4 que plus récemment. Le classement dans la famille SLC4 est dû aux similitudes de séquence avec les autres membres de la famille à hauteur de 20% d'identité en moyenne (Romero *et al.*, 2004). BTR1 s'exprime dans le rein, les glandes salivaires, la thyroïde ainsi que dans la cornée. Il s'agit d'un symport borate/sodium (Vithana *et al.*, 2006).

Bien que présent dans un grand nombre de tissus BTR1 n'a jusqu'à présent été impliqué que dans un seul type de pathologie humaine : la dystrophie congénitale endothéliale de type 2 (CHED2) (Vithana *et al.*, 2006) Cette pathologie est présente chez l'homme sous deux formes aux phénotypes communs mais ayant une cause génétique différente: le type I est une forme autosomale dominante non liées à BTR1 et le type II autosomale récessive liée à des mutations dans le gène *SLC4A11*. Cette pathologie se caractérise par une opacification au de la cornée dès la naissance accompagnée le plus souvent par une perturbation de la coordination des muscles de l'œil. Dans le cas du type 2 la pathologie est due à l'absence de la protéine BTR1 à la membrane cellulaire et/ou à une perte de fonction de la protéine BTR1

1.2 Autres échangeurs de chlorure et de bicarbonate dans la famille des SLC26.

Les SLC4A1, -A2 et -A3 ne sont pas les seuls à effectuer de l'échange chlorure/bicarbonate. Plusieurs protéines, dans la famille des SLC26 notamment, sont capables de faire de l'échange d'anion impliquant chlorures et bicarbonates. Cependant à la différence des SLC4A1, A2 et A3 ces derniers ne sont pas forcément électroneutres. Généralement, les membres de cette famille sont liés au transport de sulfates ou ont des similitudes avec ces transporteurs (Markovich, 2001). Structurellement parlant, ils ont en commun 10 à 14 segments transmembranaires, des régions C- et N-terminales intracellulaires et une région de 22 acides aminés appelée « motif de transport du sulfate » localisée près de la région N-terminale des segments transmembranaires (Moseley *et al.*, 1999). Nous pouvons retrouver dans la majorité des cas un domaine PDZ jouant un rôle dans l'interaction protéine-protéine, du côté C-terminal. Leur domaine C-terminal compte aussi systématiquement un domaine STAS, « Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist (STAS) domain », (Aravind *et al.*, 2000, Sharma *et al.*, 2011). Ce domaine STAS à la capacité d'interagir avec des nucléotides (Aravind *et al.*, 2000) ainsi qu'avec des protéines, notamment CFTR dans le cas de SLC26A6 (Ko *et al.*, 2004).

1.2.1 SLC26A3.

Le gène *SLC26A3* code pour la protéine DRA (« Down Regulated in Adenoma »). Cette protéine est exprimée dans le colon, l'iléon, la glande sudoripare, la vésicule séminale, et le pancréas. (Scott *et al.*, 1999). Chez l'homme, cette protéine est associée à plusieurs maladies congénitales dont la CLD, « Congenital chloride diarrhea », qui se caractérise par une perte massive de chlorure via les selles (Moseley *et al.*, 1999).

DRA est un échangeur chlorure/base. Selon l'environnement où il est exprimé il peut prendre en charge différents composés. Ainsi il agit comme un échangeur chlorure /bicarbonate dans le colon et l'iléon lorsqu'il s'exprime à l'apex des cellules épithéliales (Melvin *et al.*, 1999). Exprimé dans des cellules en culture il effectue un échange classique chlorure/bicarbonate sodium-indépendant mais peut aussi prendre en charge du sulfate, de l'oxalate, du bromure et du nitrate à des niveaux plus bas (Mahajan *et al.*, 1996, Chernova *et al.*, 2003) Exprimé dans l'ovocyte de xénope il peut faire de l'échange chlorure/chlorure ou chlorure/bicarbonate (Chernova *et al.*, 2003). Chez la souris, DRA effectue un échange chlorure/sulfate dans le caecum (Whittamore *et al.*, 2013).

Chez l'homme, les capacités d'échange de cette protéine la rapprochent de manière assez significative des échangeurs anioniques de la famille des SLC4 et notamment de l'AE1. En effet, les ions qu'elle peut prendre en charge sont globalement les mêmes que ceux de l'AE1. Seuls changent les lieux d'expression et les constantes de transport entre l'AE1 et DRA. Enfin, DRA et l'AE1 peuvent interagir de manière fonctionnelle avec la CAII mais seule l'AE1 possède un site de liaison physique avec la CAII (Sterling *et al.*, 2002).

Le domaine STAS de DRA est connu pour être en interaction avec CFTR, via son « R domain », domaine de régulation de CFTR, (Ko *et al.*, 2004). Deux autres études ont permis de montrer que l'expression simultanée de DRA et CFTR dans les cellules du canal du pancréas et les cellules épithéliales de la trachée permet d'augmenter l'expression de DRA (Wheat *et al.*, 2000, Greeley *et al.*, 2001). Avec cette surexpression de DRA ces cellules montrent une augmentation de l'échange chlorure/bicarbonate. Selon les auteurs, chez les malades atteints de fibrose kystique ayant la diminution de la sécrétion de bicarbonate serait en partie due à la diminution de l'échange chlorure/bicarbonate effectué par DRA.

1.2.2 SLC26A4.

Le gène *SLC26A4* code pour la protéine appelée pendrine. La pendrine s'exprime dans l'oreille interne, les cellules folliculaires de la thyroïde et le rein, dans les cellules du canal collecteur (Royaux *et al.*, 2000, Royaux *et al.*, 2001).

Cette protéine prend son nom à cause à la pathologie à laquelle elle est associée chez l'homme : Le syndrome de Pendred. Il s'agit d'une maladie génétique qui se caractérise par une surdité associée à des anomalies de formation des os de l'oreille interne et un goitre de la thyroïde causé par une anomalie de l'influx d'iode dans les cellules thyroïdiennes.

La famille SLC26 est appelée « sulfate/anion transporter family » dans la littérature (Vincourt *et al.*, 2002), or la pendrine peut échanger des chlorures ou de l'iodure contre du bicarbonate ou de l'hydroxyde mais de manière surprenante pas de sulfate (Scott *et al.*, 1999, Scott *et al.*, 2000). Exprimé dans l'ovocyte de xénope, la pendrine peut échanger du formate contre des ions chlorure (Scott *et al.*, 2000).

Malgré son implication dans des pathologies de l'oreille interne et de la thyroïde, cette protéine a d'abord été caractérisée pour son activité rénale. La pendrine effectue un échange chlorure/bicarbonate dans la partie apicale des cellules β -intercalaires du rein où la bande 3 effectue un travail comparable dans la partie basolatérale des cellules α -intercalaires (van Adelsberg *et al.*, 1993).

1.2.3 SLC26A6.

SLC26A6 code pour la protéine PAT-1 chez l'homme (Knauf *et al.*, 2001). PAT-1 est une protéine de 85 kDa qui s'exprime principalement dans le rein, le cœur, le pancréas, le foie, le muscle squelettique, l'intestin, et le placenta.

Il a été mis en évidence que PAT-1 effectuait un échange chlorure/anion, où l'anion pouvait être du sulfate, des ions hydroxyde, du bicarbonate ou de l'oxalate (Lohi *et al.*, 2003). PAT-1 effectue un échange électrogénique avec un chlorure contre deux anions (Ko *et al.*, 2004).

PAT-1 a un rôle majeur dans la régulation du pH des cardiomyocytes (Alvarez *et al.*, 2005). Il a été montré qu'une altération dans la fonction d'échange de PAT-1 pouvait avoir un impact important sur la contractilité des cellules cardiaques.

SLC26A6 possède au moins deux domaines d'interaction avec des protéines : un domaine STAS et un domaine PDZ (Lohi *et al.*, 2003). Le domaine STAS de *SLC26A6* forme un site

d'interaction potentiel avec la CAII, l'anhydrase carbonique II (Alvarez *et al.*, 2005). Nous l'avons vu précédemment la CAII est un partenaire privilégié de l'AE1 dans les érythrocytes.

1.2.4 SLC26A7.

Le gène *SLC26A7* code pour la protéine SLC26A7 chez l'homme et a été cloné en 2002 (Vincourt *et al.*, 2002). Cette étude a montré que le SLC26A7 avait 30% d'identité avec SLC26A3 et que la séquence protéique compte 2 sites potentiels de N-glycosylation conservés dans au moins deux autres membres de la famille : SLC26A3 et SLC26A4 (Vincourt *et al.*, 2002). SLC26A7 est une protéine de 656 aminoacides composé de 12 segments transmembranaires. Chez l'homme elle s'exprime principalement dans le rein, du côté basolatéral des cellules α -intercalaires du canal collecteur (Kujala *et al.*, 2005), dans l'estomac (Petrovic *et al.*, 2003) et le cortex cérébral (Kujala *et al.*, 2005).

Dans le rein, une analyse par northern blot des pré-ARNm révèle la présence possible de deux isoformes de la protéine se différenciant par les 11 derniers acides aminés de leur côté C-terminal (Vincourt *et al.*, 2002).

1.2.5 SLC26A9.

Chez l'homme le SLC26A9 est exprimé dans l'estomac, les poumons et la trachée (Lohi *et al.*, 2002).

Exprimée dans des HEK293, la protéine SLC26A9 effectue un échange chlorure/bicarbonate. *In vivo*, SLC26A9 aurait un rôle « protecteur » en jouant sur l'acidité des fluides sécrétés par l'organisme : dans les poumons, où elle contribue à la régulation et la sécrétion du liquide de surface pulmonaire (Tarran *et al.*, 2001), et dans l'estomac où elle participe, via la sécrétion de bicarbonate, à la neutralisation du pH acide de l'estomac à la proximité des cellules épithéliales.

2 Objectifs.

L'équipe que j'ai rejointe a mis en évidence les propriétés de transport de cations par l'AE1 humain. Un petit nombre de mutations ponctuelles de l'AE1 induisent une voie de conductance peu sélective pour le Na^+ et le K^+ au sein de l'AE1 qui peut soit conserver son activité d'échange anionique intacte soit la perdre. Aussi, la question s'est posée d'identifier le site de transport des cations. La possibilité pour cette protéine considérée comme un modèle d'échange électroneutre de fonctionner comme une voie de conductance bouleverse un dogme et il nous a semblé important de pouvoir caractériser cette conductance au niveau moléculaire. Aussi, mon premier objectif a été de savoir si la conductance cationique et l'échange anionique empruntaient le même site de transport dans le domaine transmembranaire de l'AE1 ou bien si les mutations faisaient apparaître un site de transport pour les cations distinct du site d'échange anionique. J'ai également cherché à identifier les acides aminés qui jouaient un rôle déterminant dans les différentes propriétés de transport de l'AE1.

Mon deuxième objectif a été de mettre au point l'expression dans la levure des mutants ponctuels de l'AE1 induisant la fuite cationique. Des études de cristallographie du domaine transmembranaire de l'AE1 sont en cours sur la forme sauvage de la protéine soit à partir d'extraits membranaires de globules rouges, soit à partir de levures exprimant l'AE1. En me basant sur le travail de l'équipe de Joe Casey ayant développé l'expression de l'AE1 dans la levure, j'ai entrepris de transformer des souches de levures avec différentes constructions de l'AE1 mutée perméable aux cations afin de permettre la production et la purification de ces formes mutées. Nous souhaitons contribuer à l'effort de cristallisation du domaine transmembranaire de l'AE1 en produisant les mutants ponctuels qui affectent les propriétés de transport de la protéine et dont la structure, par comparaison à la forme sauvage, permettra éventuellement de mettre au point des inhibiteurs spécifiques de la fuite cationique qui est pathogène.

Enfin, un troisième objectif de mon travail de thèse a été de valider expérimentalement une structure tridimensionnelle de la protéine obtenue par modélisation par homologie grâce à une collaboration avec Catherine Etchebest (INTS, Inserm U665, université Paris-Diderot).

Résultats

3 Résultats commentés.

3.1 Préambule

Afin de savoir si les cations et les anions empruntent un unique site de transport ou des sites séparés, nous avons eu recours au criblage par mutation cystéine ou SCAM (Substituted-cysteine accessibility method). C'est une méthode permettant de mesurer l'accessibilité au solvant d'acides aminés en les remplaçant par des cystéines par mutagenèse dirigée.

Cette technique est basée sur plusieurs points essentiels :

- En milieu aqueux, les réactifs sulfhydryle réagissent 5×10^9 fois plus rapidement sur les cystéines ionisées (Cys-S⁻, forme majoritaire à pH7 en milieu aqueux lorsque le soufre de la cystéine n'est pas impliqué dans une liaison covalente -S-S- d'un pont disulfure) que sur les cystéines non-ionisées (Cys-SH).
- Le groupe sulfhydryle se trouvant dans un milieu lipidique ou à l'intérieur de la protéine ne réagit pas aux réactifs sulfhydryle. Dans ces environnements non-aqueux la cystéine est sous forme majoritaire Cys-SH à cause d'un changement de la constante diélectrique du milieu.
- Les cystéines impliquées dans des ponts disulfures ne sont pas sensibles aux réactifs sulfhydryles.

Les seuls résidus sensibles seraient donc ceux présents à la surface de la protéine et les résidus tapissant l'intérieur du canal ou du pore, accessibles au solvant, dans le cas d'un canal ionique ou d'un échangeur comme l'AE1 (figure 18).

Coupler le SCAM avec des mesures fonctionnelles d'échange chlorure/bicarbonate ou de la fuite de cations, avec ou sans réactifs se fixant sur les cystéines, permet de déterminer si les acides aminés sont accessibles au solvant et s'ils participent à l'échange chlorure/bicarbonate de la protéine sauvage et/ou à la fuite de cations opérée via l'AE1 muté.

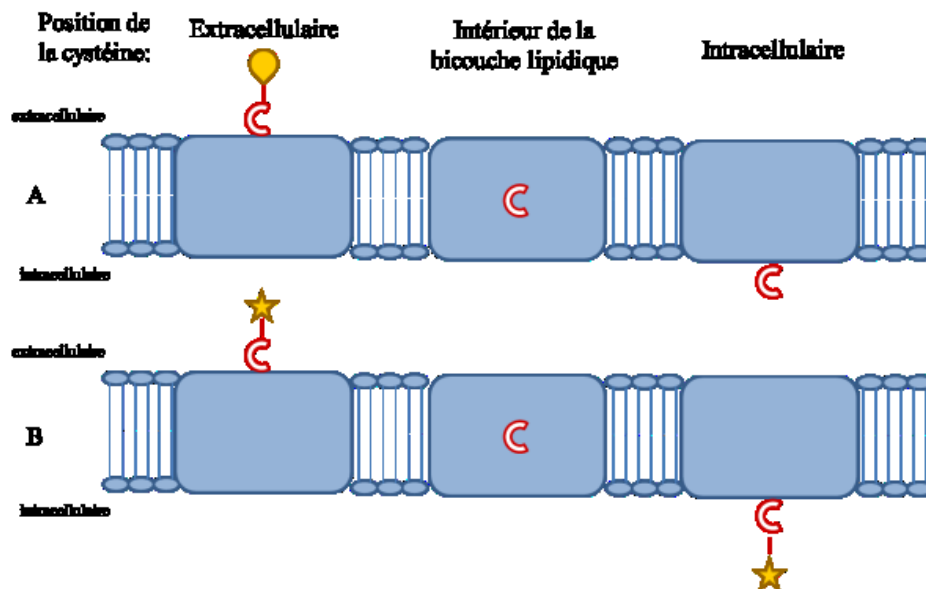


Figure 18. Fixation des réactifs sur les cystéines en fonction de leur localisation dans la protéine.
A) avec un réactif imperméant aux membranes cellulaires (●). B) avec un réactif perméant aux membranes cellulaires (★).

3.2 Identification du site de passage des cations dans l'AE1.

Un des premiers aspects que nous avons essayé de décrypter était de savoir quel était l'impact des mutations pathologiques sur la structure de l'AE1. Pour cela nous avons décidé de vérifier si le site d'échange chlorure/bicarbonate et le site de passage des cations ne formaient qu'un seul et même pore modifié par les mutations ponctuelles.

Pour répondre à cette question, nous avons évalué sur un AE1 muté perméable aux cations, l'accessibilité aux cations d'acides aminés impliqués dans l'activité d'échange anionique.

3.2.1 Création des mutants de l'AE1 dans le TM8.

Notre modèle d'expression est l'ovocyte de xénope. Sur ce modèle il n'était pas possible de travailler avec l'AE1 sans cystéine parce que cette version de l'AE1 ne s'exprime pas à la membrane plasmique dans l'ovocyte de xénope, ou s'exprime à un niveau tel qu'il n'est pas détectable ni en western blot à partir d'échantillons de membranes plasmique ni lors des expériences de mesure d'échange chlorure/bicarbonate. L'utilisation de l'ovocyte de xénope a nécessité l'utilisation de mutants de l'AE1 intégrés dans un plasmide compatible avec l'expression dans ce modèle. Le plasmide que nous avons utilisé est pSP65-wteAE1.

Pour étudier la fuite de cations nous avons pris comme modèle d'étude le mutant H734R de l'AE1. Notre choix s'est porté sur ce mutant car il perd complètement son échange chlorure/bicarbonate et induit une fuite cationique importante.

Les constructions pSP65 contenant l'AE1 sauvage et l'AE1 H734R avaient déjà été utilisées et leur expression validée dans l'ovocyte au laboratoire (Bruce *et al.*, 2005, Guizouarn *et al.*, 2007). Nous avons introduit dans l'AE1 sauvage et l'AE1-H734R les substitutions cystéines : A666C, S667C, L669C, L673C, L677C, L680C, ou I684C (figure 19). Les acides aminés : alanine 666, sérine 667, les leucines 669, 673, 677 et 680, et l'isoleucine 684 ont été validés comme partie intégrante du site de translocation des anions sur l'AE1 sauvage sans cystéine par l'équipe de Joe Casey dans les cellules HEK293. Ces résidus sont alignés le long du TM8 de l'AE1 (Tang *et al.*, 1999) (figure 19).

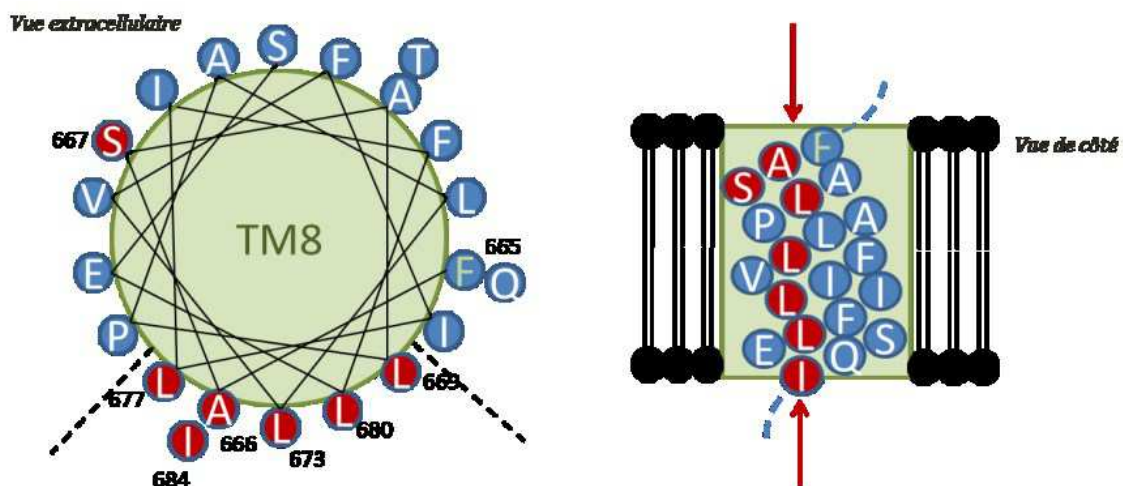


Figure 19. Mutations ponctuelles cystéine du segment transmembranaire 8.

Ce schéma montre en rouge les mutations ponctuelles en cystéines utilisées originellement par J Casey (Tang *et al.*, 1999), positionnées dans le modèle topologique proposé par Q. Zhu (figure 16). Le segment transmembranaire 8 est représenté en hélice α .

Ces mutations sont effectuées comme décrit dans la section « matériel et méthodes » par PCR. Les couples d'amorces utilisés pour les mutations dans pSP65 AE1 ou pSP65 AE1-H734R sont identiques pour chaque mutant cystéine.

Pour valider les mutations, les plasmides créés sont séquencés. Ils sont ensuite transcrits en ARN, puis injectés dans les ovocytes de xénopes.

Deux à trois jours après injection la variation du $\text{pH}_{\text{intracellulaire}}$ et/ou le flux de lithium de chaque ovocyte est mesuré. Les ovocytes sont incubés ou non avec des agents thioalkylants dont la charge et la taille diffèrent. Ces composés réagissent spécifiquement avec les résidus sulfhydryles (-S-H) présents sur les cystéines. Nous avons utilisé du PCMB (anionique), du

MTSET (cationique), ou du MTSEA (cationique et partiellement neutre avec une proportion de 10 pour 1 à pH 7,5). La forme neutre du MTSEA peut passer la membrane plasmique et donc peut réagir avec les cystéines intracellulaires accessibles, mais reste minoritaire aux pH extra et intra-ovocytaires au moment des incubations et des mesures.

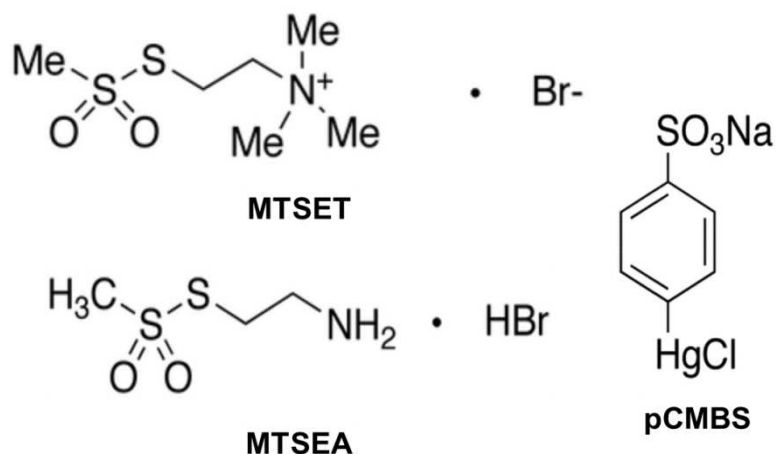


Figure 20 : Réactifs sulfhydryles

Représentation des réactifs sulfhydryles utilisés pour bloquer spécifiquement les mutants de l'AE1 portant des cystéines réintroduites par mutation ponctuelle. Ces composés se fixent de manière covalente aux résidus soufrés des cystéines accessibles au solvant.
p-chloromercuribenzenesulfonate (pCMBS), 2-aminoethylméthane-thiosulfate-hydrobromide (MTSEA) et 2-(triméthylammonium)éthylméthane-thiosulfonatebromide (MTSET).

3.2.2 Mesure de pH_i et de lithium dans l'ovocyte sur wtAE1 et AE1-H734R.

Nous avons reproduit dans notre modèle d'expression ovocytes les données obtenues par le groupe de J. Casey avec les cellules HEK293 exprimant les protéines AE1 dépourvues de cystéine. En effet la technique de SCAM nécessite idéalement un environnement dépourvu de cystéine accessible (en dehors de la mutation ponctuelle introduite pour le test). Les réactifs utilisés se fixent sur toutes les cystéines accessibles. Donc la présence d'autres cystéines que la cystéine du test réduit la spécificité et l'efficacité du test. Cependant, nous avons observé qu'un AE1 dépourvu de cystéine s'exprimait très mal dans l'ovocyte de xénope, aussi nous avons travaillé avec un AE1 qui a conservé ses cystéines endogènes (au nombre de cinq dans le domaine transmembranaire) dont une cystéine accessible du côté extracellulaire, la cystéine 479 (Jarolim *et al.*, 2004).

3.2.3 Effets des réactifs sur les mutants cystéines de l'AE1 sauvage.

La mesure de l'échange chlorure/bicarbonate sur les ovocytes exprimant l'AE1 sauvage avec ou sans agents thiolalkylants (PCMBs ou MTSEA) ne varie pas. Cela suggère que les

cystéines endogènes ne sont pas accessibles aux réactifs ou que ces cystéines sont situées sur des positions qui ne sont pas impliquées dans une activité d'échange d'anions (figure 20A). Le PCMBs est capable d'inhiber l'échange d'anions dans des ovocytes exprimant les protéines AE1 mutées A666C, L669C, L673C, L677C, ou I680C. En revanche, aucune inhibition n'a été observée avec des ovocytes exprimant l'AE1 I684C et S667C, contrairement à l'étude menée par XB. Tang.(Tang *et al.*, 1999). L'addition de MTSEA avant la mesure de l'activité $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de l'AE1 permet de diminuer de manière significative cet échange mais seulement dans des ovocytes exprimant le mutant I684C alors que Tang *et al.* ont également observé une inhibition d'échange d'anions (d'environ 25%) par le MTSEA sur les positions 673 et 677 dans des cellules HEK293.

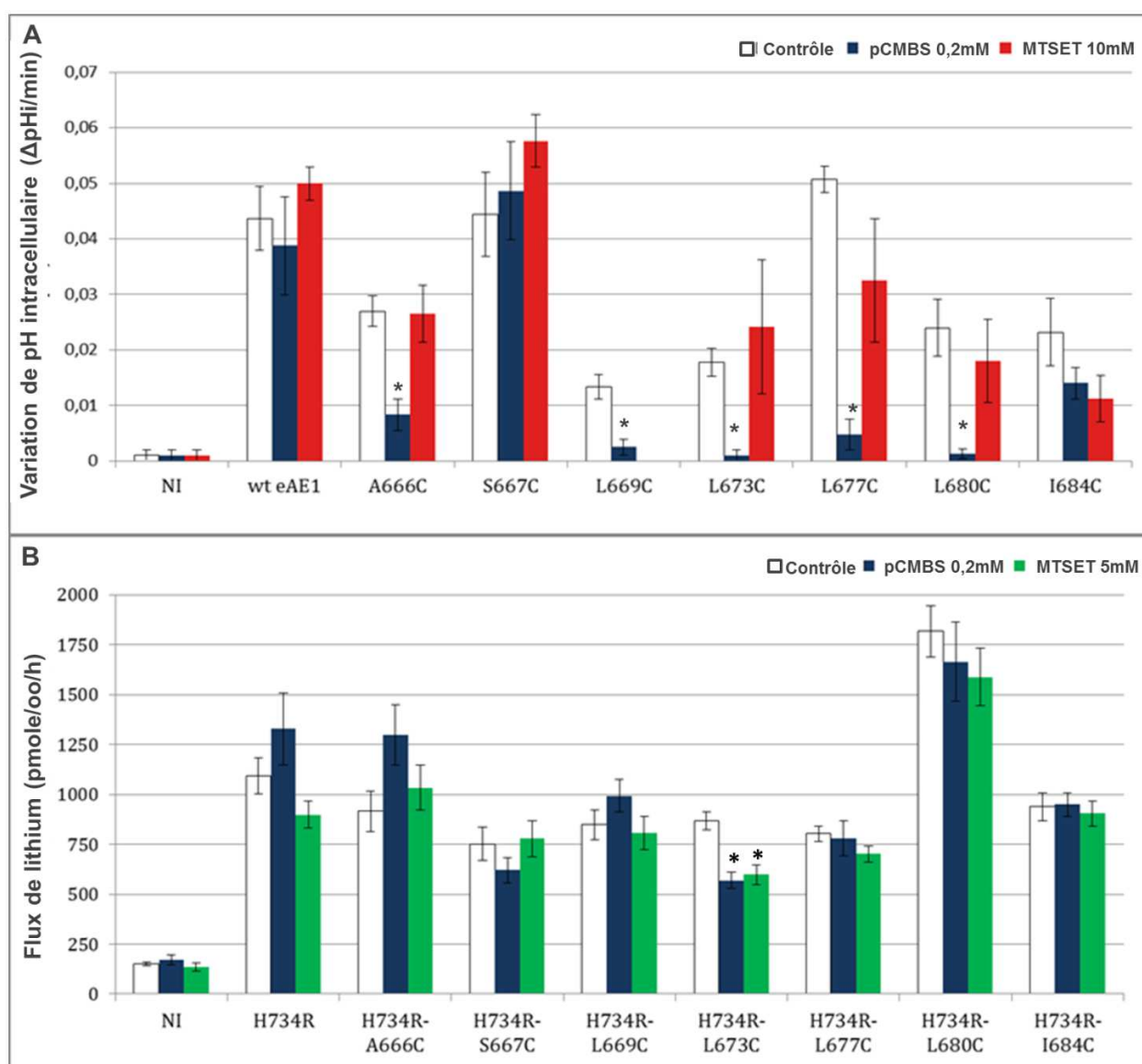


Figure 21. Mesure du passage des ions via la protéine AE1 dans l'ovocyte de xénope.
A. Mesure de l'échange chlorure/bicarbonate représenté par la variation du pH intracellulaire d'ovocytes exprimant l'AE1 sauvage ou portant une des mutations « cystéine » noté en abscisse (NI= non-injecté).
B. Mesure de l'entrée de lithium dans les ovocytes de xénope exprimant un mutant H734R ou portant en plus une des mutations « cystéine » noté en abscisse (NI= non-injecté).

3.2.4 Effets des réactifs sur les mutants cystéines de l'AE1-H734R.

Le mutant H734R n'échange pas d'anions (chlorure ou bicarbonate) mais forme une voie de conductance pour le potassium et le sodium. L'inconvénient de ces deux ions est qu'ils sont présents en abondance dans les cellules et les milieux de culture. Une des manières efficaces de mesurer le passage de ces cations est d'utiliser des isotopes radioactifs ^{22}Na et ^{86}Rb . Pour nous affranchir de la radioactivité nous avons utilisé du lithium qui passe aussi par l'AE1-H734R et a l'avantage de n'être ni radioactif ni présent dans les milieux de culture ou de mesure.

Comme l'illustre la figure 19B, l'action du PCMBs ou du MTSET ne modifie pas significativement l'influx de lithium dans les ovocytes exprimant les mutants H734R-cystéine : A666C, S667C, L669C, L677C, L680C, ou I684C. Toutefois, pour les ovocytes exprimant l'AE1-H734R-L673C, la quantité de lithium mesurée est significativement diminuée par l'action du PCMBs ($-43 \pm 6\%$) et du MTSET ($-42 \pm 6\%$).

3.2.5 Importance du segment transmembranaire 8.

Les expériences que nous avons réalisées au laboratoire nous ont permis de mettre en lumière les points suivants :

- L'expression dans l'ovocyte de xénope a permis de reproduire en partie les résultats publiés par Tang et al. dans des cellules HEK 293.
- L'utilisation des réactifs se fixant sur des cystéines introduites sur la position 673 permet de diminuer de manière significative aussi bien l'échange chlorure/bicarbonate pour l'AE1 sauvage que le transport de cations dans le cas du mutant H734R de l'AE1.
- L'ensemble de ces données nous permet de valider l'implication du TM8 dans l'échange chlorure/bicarbonate et dans la fuite de cations. Il n'y a donc qu'un seul site de transport impliquant le TM8.

3.3 Conformation du site de passage des ions dans l'AE1.

3.3.1 La boucle intracellulaire 690-705.

Quel que soit le modèle topologique utilisé (figures 9 et 16), entre les segments transmembranaires 8 et 9, l'AE1 possède une boucle intracellulaire qui comporte une quinzaine

d'acides aminés. Cette boucle contient les acides aminés 690 à 705. Nous avons comparé la séquence des acides aminés de l'AE1₆₉₀SKPERKMKVKGSGFHLD₇₀₅ avec les séquences équivalentes de différents échangeurs anioniques présents chez l'Humain (AE2 et AE3) ainsi que chez d'autres espèces vertébrées (rat, lapin par exemple) ou invertébrées (drosophile, *C. elegans*) (Tableau C). La drosophile et *C. elegans* ne possèdent qu'une seule version d'échangeur anionique noté « AE » et non pas trois (AE1, AE2 et AE3) comme chez les vertébrés.

Le tableau C inclut aussi un autre membre de la famille des SLC4, le NBCe1, un échangeur sodium/bicarbonate de la famille des Slc4.

Tableau C. Comparaison de la séquence d'acides aminés₆₉₀SKPERKMKVKGSGFHLD₇₀₅ suivant le segment transmembranaire 8.

En rouge sont représentés les acides aminés différents de ceux de l'AE1 humain dans la séquence 690-705.

Transporteur/Espèce		Acides aminés															Position de départ	
AE1	Humain	S	K	P	E	R	K	M	V	K	G	S	G	F	H	L	D	690
	Souris (<i>Mus musculus</i>)	S	K	P	E	R	K	M	I	K	G	S	G	F	H	L	D	708
	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	S	K	P	E	R	K	M	I	K	G	S	G	F	H	L	D	706
	Poulet (<i>Gallus gallus</i>)	S	K	P	E	R	K	L	V	K	G	S	G	F	H	L	D	701
	Truite	S	K	P	E	R	K	M	V	K	G	S	G	F	H	L	D	703
	Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	S	K	P	E	R	K	M	V	K	G	S	G	F	H	M	D	632
	Raie	S	K	P	D	R	K	M	V	K	G	S	G	F	H	L	D	677
AE2	Humain	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	1019
	Souris (<i>Mus musculus</i>)	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	1016
	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	1013
	Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	1016
	Cochon d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	1017
	Poulet	S	K	K	E	R	M	L	Q	K	G	S	G	F	H	L	D	999
	Poisson globe (<i>Tetraodon fluviatilis</i>)	S	K	K	E	R	M	L	V	K	G	S	G	F	H	L	D	1063
	Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	S	K	K	E	R	M	L	V	K	G	S	G	F	H	L	D	1007
Raie	S	K	K	E	R	M	L	T	K	G	S	G	F	H	L	D	996	
AE3	Humain	S	Q	K	A	R	R	L	L	K	G	S	G	F	H	L	D	1012
	Souris (<i>Mus musculus</i>)	S	Q	K	A	R	R	L	L	K	G	S	G	F	H	L	D	1007
	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	S	Q	K	A	R	R	L	L	K	G	S	G	F	H	L	D	1007
	Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	S	Q	K	A	R	R	L	L	K	G	S	G	F	H	L	D	1013
	Poisson globe (<i>Tetraodon fluviatilis</i>)	S	K	K	E	R	R	L	V	K	G	S	G	F	H	L	D	554
	Raie	S	K	K	E	R	H	L	V	K	G	S	G	F	H	L	D	998
NBC	Humain-1	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	A	G	Y	H	L	D	763
	Humain-2	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	A	G	Y	H	L	D	725
	Humain-3	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	C	G	Y	H	L	D	809
	Souris (<i>Mus musculus</i>)	N	R	K	E	H	K	L	Q	K	G	A	G	Y	H	L	D	807
	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	A	G	Y	H	L	D	763
	Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	A	G	Y	H	L	D	763
	Salamandre	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	A	G	Y	H	L	D	763
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	N	R	K	E	H	K	L	K	K	G	C	G	Y	H	L	D	804
AE	Drosophile	D	K	P	D	R	G	L	K	K	G	S	G	L	H	W	D	
	Anophele	D	K	P	E	R	G	L	K	K	G	S	G	L	H	M	D	
<i>Séquences Conservées dans les SLC4</i>		<i>K G G H D</i>																
<i>Charges conservées dans les AE1</i>		<i>+ - + + + -</i>																

L'alignement des séquences d'acides aminés des AE1, AE2 AE3 et NBC provenant d'espèces différentes dans la région de la protéine située entre les segments transmembranaires 8 et 9 montre que cette région est hautement conservée. L'analyse du tableau C en prenant en compte toutes les protéines alignées fait ressortir une série d'acides aminés particulière : KGxGxHxD.

La séquence KGxGxHxD est conservée dans l'ensemble des protéines que nous avons comparées. Elle pourrait être importante pour le transport de bicarbonate via les échangeurs anioniques et/ou les NBC (sodium/bicarbonate cotransporteur). De plus, ce motif est apparu comme regroupant deux mutations naturelles chez l'homme associées à une fuite de cations. Il s'agit des mutants G701D et D705Y qui sont respectivement la deuxième glycine et l'acide aspartique que nous avons mis en évidence dans notre séquence conservée.

L'alignement montre que certaines charges en amont de cette séquence consensus sont conservées parmi les AE1 de différentes espèces. Ces charges sont positionnées, dans le modèle topologique, du côté N-terminal de la boucle intracellulaire située entre les segments transmembranaires 8 et 9 (séquence KPERKxxK dans l'AE1 humain). Il s'agit d'un résidu négatif et de quatre résidus positifs.

3.3.2 Etude des acides aminés et de charges conservés de la séquence 690-705.

L'étude du rôle de ces motifs conservés sur les propriétés de transport de l'AE1 a été faite en s'appuyant sur des mutations ponctuelles des acides aminés impliqués.

Nous avons substitué chacun des acides aminés de la séquence KGxGxHxD : lysine 698, glycine 699, sérine 700, glycine 701, phénylalanine 702, et histidine 703 avec une cystéine pour évaluer le rôle de chaque acide aminé de cette séquence dans le fonctionnement de l'AE1.

En parallèle d'autres mutations ont été faites sur la séquence KPERKxxK pour évaluer l'implication des acides aminés chargés dans l'échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Nous avons effectué les substitutions suivantes : K691Q, E693Q, R694G/Q/D, K695L, K698G/Q/D, et D705C/G/K. Les acides aminés chargés positivement ont été remplacés par des acides aminés chargés négativement ou sans charge mais de taille comparable à l'acide aminé de départ. De même les acides aminés chargés négativement ont été remplacés par des acides aminés chargés positivement ou sans charge. La proline 692 conservée parmi les AE1 a également été substituée en leucine. L'ensemble des mutations effectuées est résumé dans le tableau D.

Tableau D. Mutations dans la séquence ⁶⁹⁰SKPERKMKVKGSGFHLD⁷⁰⁵ intracellulaire de l'AE1 située entre les TM 8 et 9.

Les acides aminés ayant une charge positive sont notés en rouge et ceux ayant une charge négative en bleu.

Séquence dans l'AE1 sauvage	Séquence d'acides aminés 690-705															
	S	K	P	E	R	K	M	V	K	G	S	G	F	H	L	D
Position	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705
Acides aminés de remplacement créés pour l'étude		Q	L	Q	D	L			C	C	C	C	C	C		C
					G				D			K				G
					Q				G							K
									Q							
Mutations naturelles												D				Y

Ces mutations dans l'AE1 ont été réalisées par PCR de la même manière que pour l'étude du segment transmembranaire 8. Les mutants de l'AE1 listés dans le tableau D ont été créés à partir du plasmide pSP65-wteAE1 et injectés sous forme d'ARN dans l'ovocyte de xénope.

3.3.3 Expression des mutants dans l'ovocyte de xénope.

Nous avons d'abord vérifié le niveau d'expression membranaire des protéines mutées en couplant les techniques de biotinylation et de visualisation par électrophorèse/western blot.

L'utilisation de la biotinylation permet de récupérer les protéines membranaires présentant une lysine accessible à la biotine. Grâce à ce procédé l'échantillon qui va ensuite être utilisé pour effectuer le SDS-Page suivi du western blot va être composé en majeure partie de protéines membranaires. Ces méthodes permettent de mesurer la quantité relative d'AE1 présent à la membrane plasmique des ovocytes.

La figure 22 illustre le niveau d'expression des différents mutants de l'AE1 que nous avons construits et exprimés dans l'ovocyte de xénope. La photo (figure 22A) est celle d'une expérience représentative des résultats finaux obtenus grâce à ces techniques. La figure 22B est un histogramme, regroupant au moins trois quantifications issues de westerns blots différents, normalisés par rapport à l'expression de la Na⁺/K⁺ ATPase sauvage et moyennés. Les barres d'erreurs représentées sont des erreurs standard à la moyenne (s.e.m.).

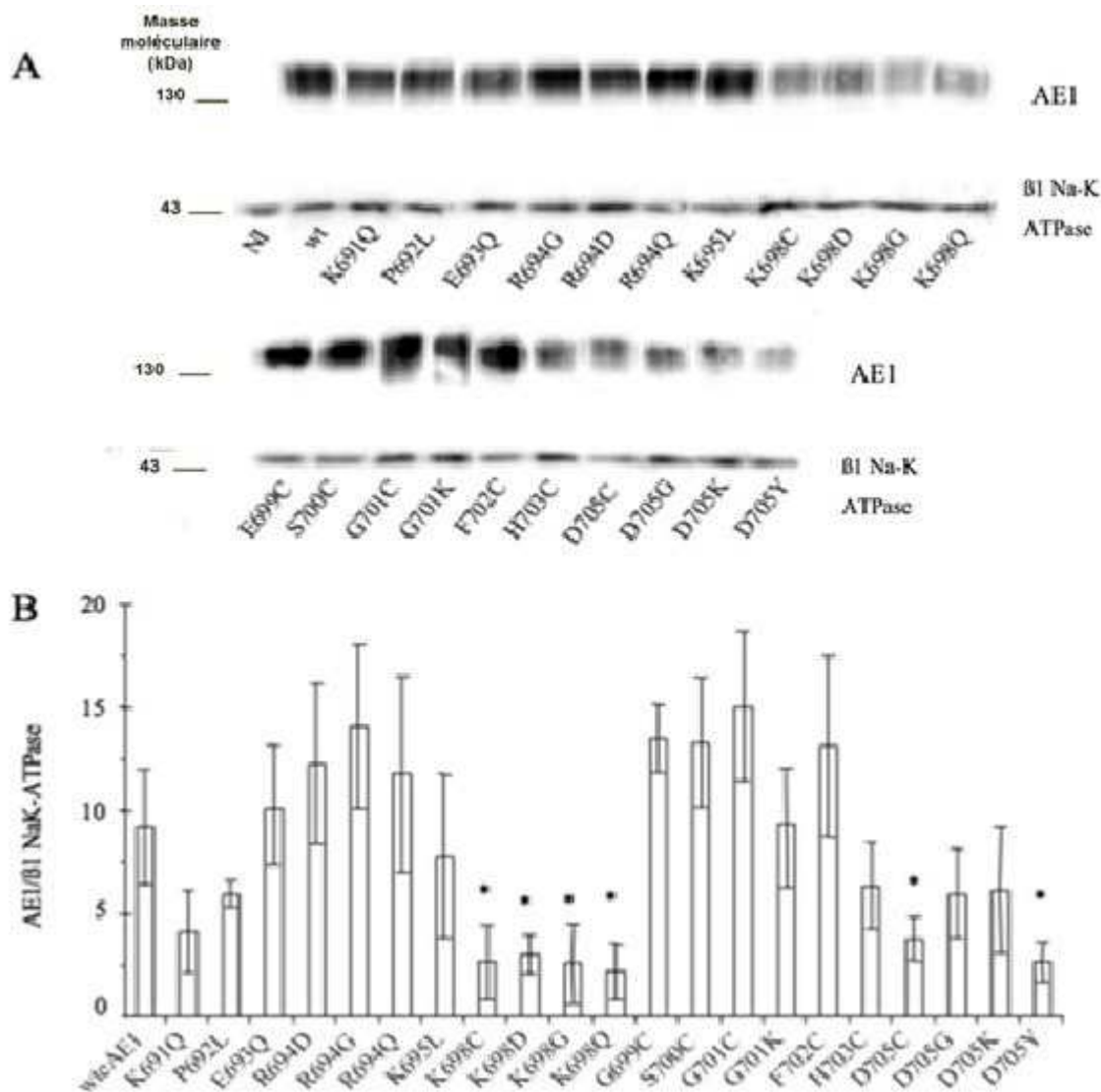


Figure 22. Expression des mutants de la séquence 690- 705 dans l'ovocyte de xénope.

La partie (A) est un western blot représentatif de ceux ayant servi à quantifier le niveau d'expression de l'AE1. Les échantillons ayant servi à sa réalisation ont été obtenus à partir de préparation de membranes d'ovocytes biotinylés injectés avec les différents mutants de l'AE1 testés.

Le graphique (B) représente le niveau d'expression de l'AE1 normalisé grâce au signal de la sous-unité β1 de la Na⁺/K⁺-ATPase en fonction des mutants de l'AE1. Regroupe les résultats d'au minimum trois western-blot différents par mutant (* student p<0,07).

Les barres d'erreurs importantes que nous avons obtenues lors de la réalisation de l'histogramme 22B ne nous permettent pas d'interpréter finement les différences d'expression membranaire entre les mutants, du fait d'une variabilité importante. Cette variabilité est sans doute exacerbée à cause de la différence entre les niveaux de détection obtenus entre l'AE1 surexprimé dans l'ovocyte et la Na⁺/K⁺-ATPase endogène. Toutefois, le signal associé aux mutants K698C/D/G/Q et D705C/Y, reste significativement inférieur à celui de l'AE1 sauvage. Ceci reflète soit un niveau plus faible d'expression de ces mutants à la membrane plasmique de l'ovocyte soit une accessibilité moindre de la biotine sur ces mutants. Néanmoins, tous les mutants s'expriment à la membrane plasmique des ovocytes.

3.3.4 Echange chlorure/bicarbonate des mutants de la séquence 690-705.

L'activité d'échange chlorure/bicarbonate des différents mutants a été évaluée comme décrit dans la section « matériel et méthodes » (figure 23, barres blanches). Elle se mesure après une charge en milieu tamponné $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. La variable mesurée est la remontée du pH intracellulaire dans un milieu sans chlorure en fonction du temps, pour l'AE1 sauvage et les différents mutants. Nous pouvons observer que les ovocytes exprimant l'AE1 avec les substitutions K691Q, P692L, E693Q, R694D/G/Q, G699C, S700C, G701C, F702C, H703C, et D705C/G étaient fonctionnels en termes d'échange d'anions. Inversement, toutes les substitutions sur la lysine 698 ont fortement réduit la capacité d'échange d'anions de la protéine. Nous avons même constaté une absence de régulation du pH après la mutation K698D. De même, la mutation K695L supprime l'activité d'échange d'anions. En revanche l'effet de la substitution de la glycine 701 dépend de l'acide aminé introduit: G701K ne semble plus en mesure d'échanger des anions alors que G701C a conservé cette capacité. Nous pouvons constater la même chose avec les mutants de l'acide aspartique 705: lorsque l'acide aspartique 705 est substitué par une cystéine ou une glycine, la protéine garde un échange chlorure/bicarbonate fonctionnel là où les substitutions par une lysine ou une tyrosine ne le permettent pas.

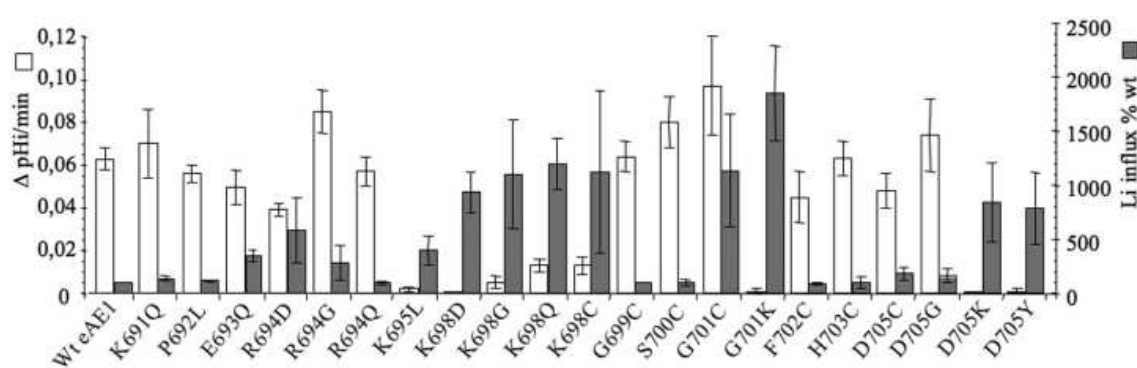


Figure 23. Mesure du passage des anions et des cations par les AE1 mutés de la boucle 690-705.

Ce graphique regroupe les mesures d'entrée de lithium (barres grises) ou de l'échange chlorure/bicarbonate (barres blanches) des mutants ponctuels de la boucle intracellulaire 690-705 de l'AE1. Chaque barre représente la moyenne d'au moins trois expériences, réalisés sur des lots différents d'au moins 9 ovocytes chacun. Les barres sont des s.e.m. (erreur standard à la moyenne).

La détection à la membrane plasmique des protéines faite par biotinylation et western blot permet d'affirmer que l'absence d'échange chlorure/bicarbonate ne résulte pas d'une absence de protéine à la membrane plasmique des ovocytes (figure 22). Cependant, une partie des différences observées lors de la mesure de l'échange chlorure/bicarbonate pourrait s'expliquer par des variations de la quantité de protéine membranaire.

Certaines mutations, notamment celles touchant la lysine 698, présentent un faible échange d'anions corrélé à une expression membranaire relativement faible. Dans ce cas il reste possible qu'une meilleure expression de la protéine permettrait de récupérer un niveau d'échange chlorure/bicarbonate plus proche de celui de la protéine sauvage. Cependant, pour un niveau d'expression voisin, l'AE1-D705C présente une activité d'échange d'anions plus importante que celle des mutants de la lysine 698.

Ainsi, il est assez difficile de corréler le niveau d'expression de la protéine et l'intensité de l'activité d'échange anionique. Néanmoins, l'absence d'échange d'anions n'est pas due à un défaut d'expression de l'AE1 à la membrane plasmique des ovocytes mais plus probablement à un effet de la mutation ponctuelle que nous avons introduite sur l'activité de transport.

3.3.5 Mesure de la perméabilité aux cations des mutants de la séquence 690-705.

Certaines mutations ponctuelles modifient sensiblement l'AE1 en faisant apparaître une fuite de cations via cette protéine. Nous avons donc vérifié si des ovocytes de xénope exprimant les AE1 mutés dans la séquence 690-705 avaient une perméabilité cationique. Pour cela nous avons mesuré l'entrée de lithium dans des ovocytes exprimant ces différents mutants ainsi que leurs contenus en sodium et potassium.

L'absorption de lithium des ovocytes exprimant les mutants de l'AE1 a été évaluée de la même manière que lors de l'étude du segment transmembranaire 8. Les résultats sont représentés dans la figure 23, barres grises. Une augmentation significative de la perméabilité au lithium est observée pour les mutants de l'AE1 E693Q, R694/D/G, K695L, K698D/G/Q/C, G701C/K, D705K/Y ($p < 0,05$). Comme pour l'échange chlorure/bicarbonate l'importance de la fuite de cations ne semble pas corrélée avec le niveau de détection des protéines AE1 mutées que nous avons relevé par western blot.

Pour compléter les observations issues des mesures d'entrée de lithium effectuées sur les ovocytes exprimant les protéines AE1 mutées de la figure 22 nous avons voulu vérifier si le contenu des ovocytes en sodium et potassium était modifié. Pour cela les ovocytes qui expriment les différentes constructions de l'AE1 sont placés dans un milieu salin contenant de l'ouabaïne et du bumétanide, respectivement inhibiteurs de la pompe sodium/potassium et du cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ NKCC (ou SLC12A2). L'utilisation de ces inhibiteurs permet de s'assurer que les mouvements de potassium et de sodium dans les ovocytes de xénope sont indépendants de l'activité de ces deux transporteurs endogènes.

Les mesures présentées dans la figure 24 sont les contenus des ovocytes en sodium et potassium trois jours après injection d'ARN codant pour les différents mutants de l'AE1. Les

données sont des moyennes de plusieurs mesures, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (s.e.m.). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues sur des ovocytes exprimant la protéine sauvage. Ainsi plus les différences des contenus en ions avec l'AE1 sauvage sont élevées plus la fuite de cations est importante.

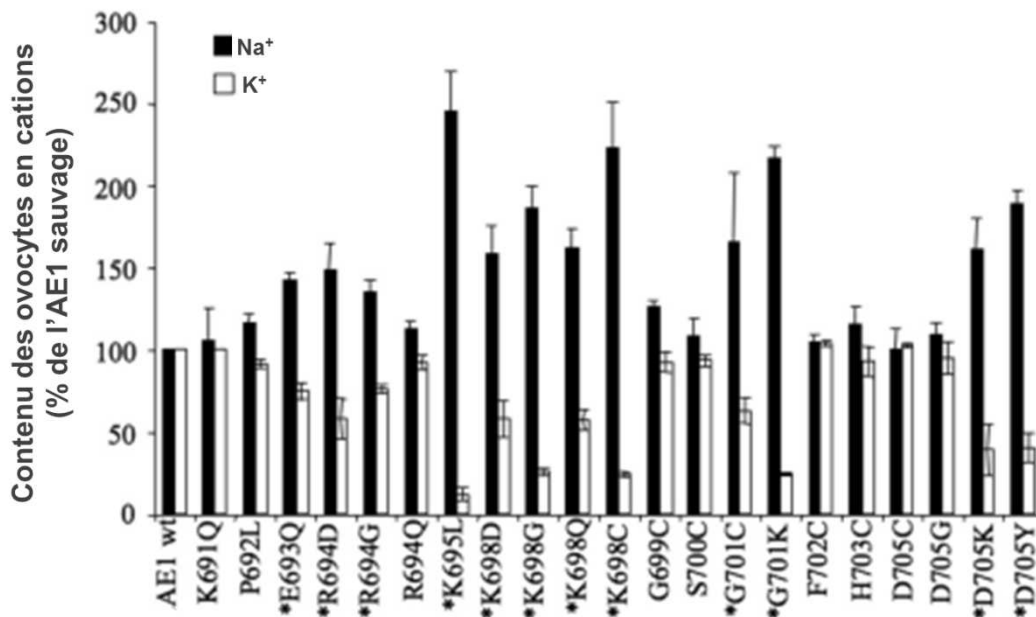


Figure 24. Contenus des ovocytes en sodium et potassium par rapport à l'AE1 sauvage.

Mesure du contenu en sodium et potassium d'ovocytes exprimant différents mutants de l'AE1. Les mesures effectuées sont des quantités de sodium et potassium en gramme du poids sec par ovocyte et par heure ensuite exprimées en pourcentage des mesures relevée sur l'AE1 sauvage

Une étoile (*) marque mutants qui présentent des différences significatives avec l'AE1 sauvage (student $p < 0,05$).

Les ovocytes injectés avec la protéine sauvage ou des ovocytes non injectés ne présentent pas de différences significatives. Les quantités de base en sodium et potassium pour ces deux condition sont : pour les ovocytes non injectés $\text{Na}^+_{\text{noninjectés}} = 48 \pm 11 \mu\text{mol/g}$ de poids sec et $\text{K}^+_{\text{noninjectés}} = 86 \pm 17 \mu\text{mol/g}$ de poids sec et pour les ovocytes exprimant la protéine AE1 sauvage $\text{Na}^+_{\text{AE1 sauvage}} = 52 \pm 13 \mu\text{mol/g}$ de poids sec et $\text{K}^+_{\text{AE1 sauvage}} = 75 \pm 18 \mu\text{mol/g}$ de poids sec, avec $n=5$ expériences par mutant.

Dans le cadre d'une fuite de cations le passage des ions se fait de la zone la plus concentrée en ions vers la zone la moins concentrée. Dans ce cas, pour le sodium il s'agit d'une entrée d'ions dans l'ovocyte alors que pour le potassium il s'agit d'une sortie d'ions.

Les contenus en sodium et potassium des mutants de l'AE1 E693Q, R694D/G, K695L, K698C/D/G/Q, G701C/K, et D705K/Y sont significativement différents de ceux de l'AE1 sauvage. Au contraire il n'y a pas de différence significative entre l'AE1 sauvage et les mutants K691Q, P692L, R694Q, G699C, S700C, F702C, H703C et D705C/G. Ce dernier groupe de mutants a donc un phénotype sauvage.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les résultats de mesure d'échange chlorure/bicarbonate et d'entrée de lithium présentés figure 22. Deux points ressortent clairement de cette comparaison :

- Les mutants ayant des fortes variations de contenus en sodium et potassium sont les mêmes que ceux ayant une importante entrée de lithium dans l'ovocyte.
- L'apparition de cette fuite de cations ne s'accompagne pas forcément d'une perte de l'activité d'échange chlorure/bicarbonate.

3.3.6 Conclusions sur la boucle intracellulaire 690-705.

Lorsque nous regardons les variations de sodium et potassium, ou l'entrée de lithium dans les ovocytes et que nous ajoutons les données relatives à l'échange chlorure/bicarbonate, nous pouvons regrouper les mutants de l'AE1 en 3 groupes différents. Dans le premier groupe les mutants ont un phénotype de type sauvage : un échange chlorure/bicarbonate détectable et aucune fuite de cations relevée (cas de l'AE1 sauvage et des mutants K691Q, P692L, R694Q, G699C, S700C, F702C, H703C, D705C/G). Le deuxième groupe présente une fuite de cations et aucun échange chlorure/bicarbonate (cas des mutations H734R, K695L, K698C/D/G/Q, G701K, D705K, D705Y). Enfin, un troisième groupe comprend les mutants présentant une fuite de cations et un échange chlorure/bicarbonate toujours fonctionnel (mutant de l'AE1 E693Q, R694D/G, et G701C/D). Ces trois groupes sont représentés figure 25.

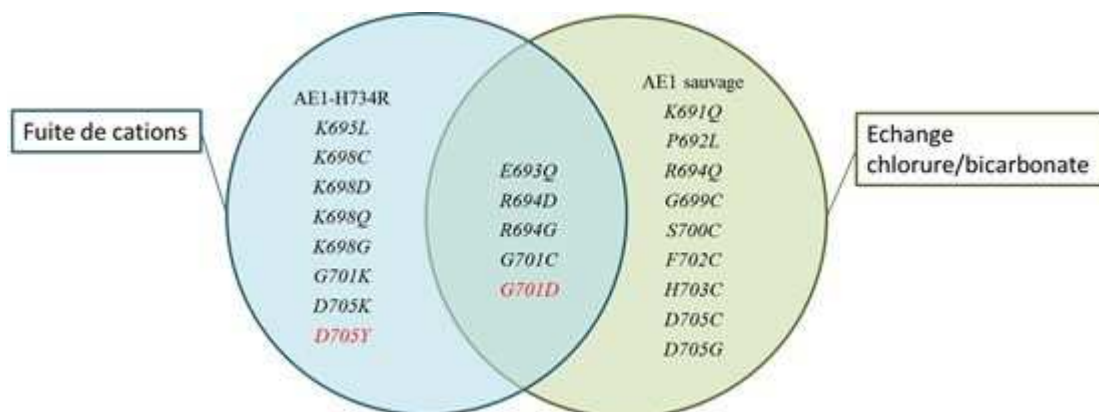


Figure 25. Passage des ions par l'AE1 sauvage et les mutants ponctuels de la boucle 690-705.

Les différents mutants de l'AE1 sont regroupés en fonction des relevés effectués lors des mesures des mouvements d'ions présentées dans les figures précédentes (les mutations liées aux pathologies humaines sont notés en rouge).

La majorité des mutations sur la boucle 690-705 a un effet sur les propriétés d'échange de l'AE1. Dans la plupart des cas cet effet est l'apparition d'une fuite de cations avec conservation ou non des propriétés d'échange d'anion de la protéine sauvage.

Nous pouvons donc proposer que la boucle intracellulaire 690-705 joue bien un rôle dans la capacité de l'AE1 à échanger des anions. En particulier le glutamate 693, l'arginine 694, les lysines 695 et 698, la glycine 701 et l'asparagine 705 sont importants pour cet échange. Des mutations ponctuelles sur ces acides aminés peuvent soit induire une perméabilité aux cations et la suppression ou la diminution spectaculaire de l'échange d'anions (mutants de l'AE1 : K698C/D/G/Q, G701K et D705K/Y), soit induire une perméabilité cationique dans un échangeur d'anions encore fonctionnel (E693Q, R694D/G, G701C). L'acide aminé de remplacement va aussi avoir de l'importance selon la position muté : par exemple au niveau de la position 705 le remplacement de l'asparagine en glycine ou en cystéine n'aura aucun effet alors que le remplacement de l'asparagine en lysine par exemple va induire la fuite de cation. Au niveau de la position 698, la charge positive de lysine semble plus importante car quel que soit l'acide aminé de remplacement (qu'ils soient de taille équivalente ou non à la lysine de départ) la fuite de cation va apparaître. En revanche, les acides aminés lysine 691, proline 692, glycine 699, serine 700, phénylalanine 702 et histidine 703 peuvent être remplacés sans aucun changement significatif dans les propriétés de transport de l'AE1: l'échange d'anions a été maintenu, et aucune perméabilité cationique n'est apparue.

3.4 Conductance cationique et échange anionique dans l'AE1.

Les données que nous avons obtenues nous ont permis de montrer que des mutations ponctuelles peuvent faire apparaître une fuite de cations via le même site que l'échange chlorure/bicarbonate au détriment ou non de ce dernier (figure 26).

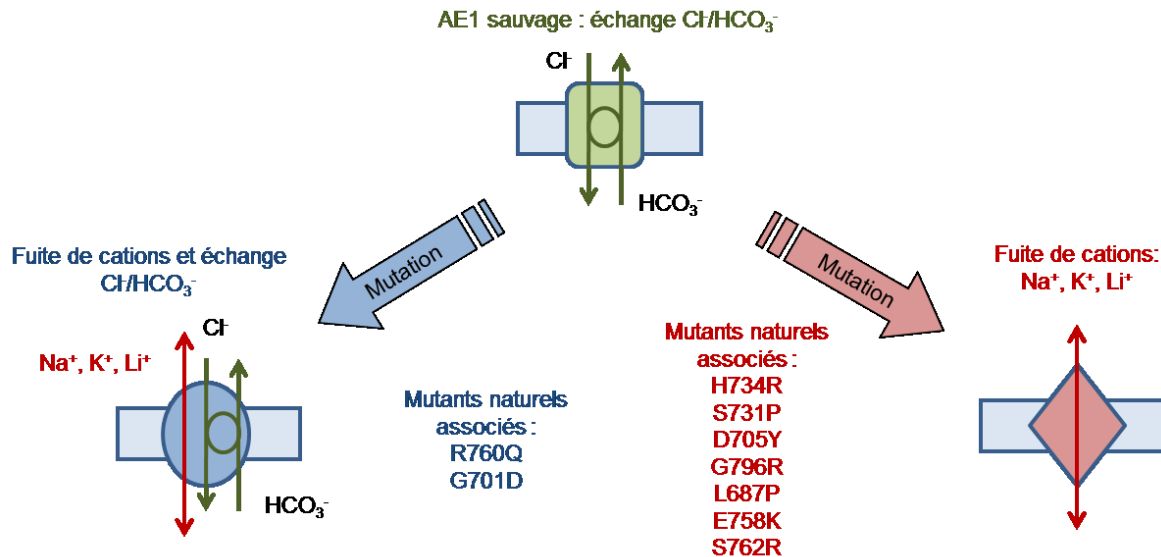


Figure 26. Différents phénotypes de l'AE1.

Cette figure résume les différents phénotypes observables lorsqu'on effectue des mutations ponctuelles dans la boucle intracellulaire 690-705 de l'AE1 ou lors des mutations ponctuelles associées aux pathologies érythrocytaires humaines.

Nous avons vu, dans la première partie de la présente étude que le passage des anions et l'échange de cations avaient en commun le segment transmembranaire 8. Par la suite, nous avons mis en évidence que la boucle intracellulaire 690-705 directement en aval de ce segment transmembranaire 8 est importante pour la sélectivité des ions pouvant transiter par ce pore commun ainsi que pour le mode de fonctionnement de la protéine. Notamment les deux charges positives portées par les deux lysines 698 et 695 semblent essentielles au fonctionnement de l'échangeur. Nos résultats nous permettent de proposer un modèle général modélisant à la fois le passage des cations, dans le cadre des pathologies humaines liées aux mutations ponctuelles de l'AE1 et le fonctionnement général de la protéine sauvage. Ce modèle est schématisé dans la figure 27.

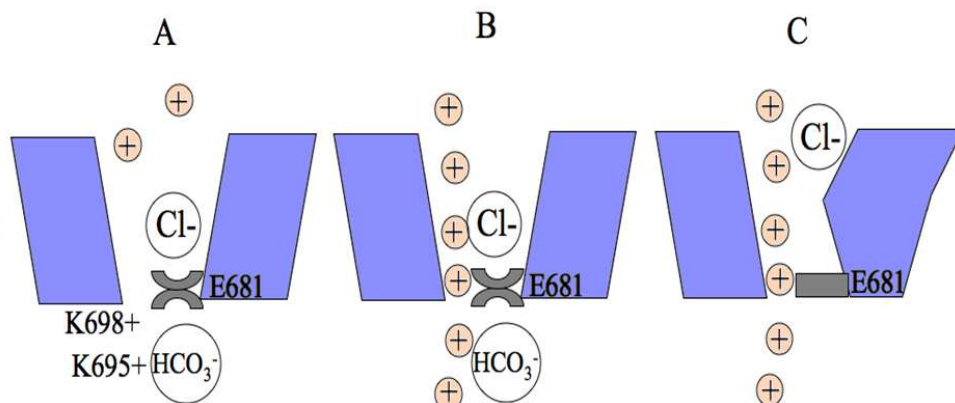


Figure 27. Vue schématique des différentes conformations fonctionnelles de l'AE1.

Sur ce schéma sont représentés les 3 états fonctionnels de l'AE1. Avec (A) : Conformation d'échange chlorure/bicarbonate (conformation sauvage), (B) Conformation d'échange chlorure/bicarbonate avec fuite de cations et (C) Conformation avec fuite de cations seule.

La conformation (A) représente l'AE1 sauvage. Dans ce cas, l'AE1 effectue un échange chlorure/bicarbonate normal et les cations ne peuvent pas passer par le site d'échange anionique. Nous avons vu dans l'introduction que le glutamate 681 avait une importance majeure dans l'échange chlorure/bicarbonate (Jennings *et al.*, 1987, Jennings *et al.*, 1988, Jennings *et al.*, 1992). En (B) il s'agit d'une conformation où l'échange chlorure/bicarbonate est conservé avec apparition d'une fuite de cations. Dans ce cas les charges portées par les lysines 695 et 698, empêchant normalement l'accès des cations au site de transport ne sont plus en vis-à-vis du pore et les cations peuvent emprunter un passage situé au niveau du segment transmembranaire 8. Dans cette configuration les capacités d'échange sont conservées car aucune modification structurale majeure n'a modifié la configuration du site d'échange des anions. Enfin, la conformation (C) possède un site de passage des ions modifié qui n'effectue plus d'échange chlorure/bicarbonate mais permet le passage des cations dont la fuite n'est pas bloquée par les charges positives des lysines K695 et K698.

3.5 Expression de l'AE1 dans la levure

De nombreuses études ont déjà été publiées sur la topologie de l'AE1 et la structure tridimensionnelle du domaine cytoplasmique de l'AE1 a été résolue par cristallographie (Zhang *et al.*, 2000). Ce n'est pas le cas pour la partie membranaire de l'AE1. L'abondance des données disponibles sur la partie cytoplasmique de la protéine contraste fortement avec les données disponibles concernant la structure tridimensionnelle du domaine membranaire. Yamaguchi T. et al. ont livré en 2010 une structure partielle de cette partie membranaire grâce à l'obtention d'un cristal de la protéine (Yamaguchi *et al.*, 2010a, Yamaguchi *et al.*, 2010b). Malheureusement la faible résolution de cette structure n'a pas permis de résoudre l'agencement des hélices ni l'organisation précise du domaine transmembranaire. Ce travail n'a pas permis d'obtenir des indications sur le mécanisme de transport à l'échelle moléculaire.

La purification de l'AE1, soit à partir de globules rouges, soit à partir de systèmes d'expression hétérologue (bactérie ou levure), a été entreprise il y a de nombreuses années. Cependant, à l'heure actuelle, ces travaux n'ont pas abouti à la production des cristaux permettant de résoudre la structure tridimensionnelle du domaine transmembranaire de l'AE1. Nous avons souhaité contribuer à ce projet en mettant au point des conditions d'expression, en système hétérologue, d'un AE1 muté incapable d'effectuer l'échange anionique mais converti en voie de conductance pour les cations. En effet, nous espérons que les avancées de cristallographie de l'AE1 sauvage pourraient être adaptées pour cristalliser un tel mutant et ainsi comprendre à l'échelle moléculaire comment une simple mutation ponctuelle modifiait aussi dramatiquement les propriétés de transport de l'AE1.

3.5.1 Production d'AE1 dans la levure.

Nous avons entrepris de développer l'expression de la protéine AE1 mutée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le but de cette démarche était de pouvoir produire de manière importante et stable la protéine sauvage ou mutée. L'objectif affiché était de fournir un outil de production fiable avant de pouvoir aboutir à une purification de la protéine compatible avec des techniques de cristallographie.

La plupart des protéines membranaires eucaryotes ne sont pas fonctionnelles lorsqu'elles sont surexprimées dans *Escherichia coli*. Trois raisons principales sont évoquées : les bactéries n'adressent pas correctement les protéines membraneaire à la membrane plasmique, les protéines membranaires eucaryotes sont souvent toxiques pour bactéries qui ne les produisent qu'à un faible niveau (Ferreira *et al.*, 1992), enfin l'épaisseur de la membrane bactérienne (≈ 25 Å) ne correspond pas bien avec la taille moyenne des régions hydrophobes transmembranaires des protéines eucaryotes ($\approx 30-35$ Å) (Lewis *et al.*, 1983).

Les premières structures de protéines membranaires eucaryotes haute résolution étaient basées sur du matériel isolé de la surexpression hétérologue dans la levure *Pichia pastoris*. Ce fut le cas pour le canal potassique Kv1.2 (Long *et al.*, 2005) et l'aquaporine SoPIP (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006) par exemple.

Par rapport à *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* offre plusieurs avantages : La possibilité d'obtenir un plasmide fonctionnel par recombinaison homologue pour les tests d'expression directe sans passer obligatoirement par des constructions dans *Escherichia coli*, la disponibilité de nombreuses souches différentes, l'existence de nombreux plasmides d'expression adaptés, et éventuellement la possibilité d'effectuer complémentation fonctionnelle *in vivo* (Ton *et al.*, 2004).

De plus selon DE Drew, bien que *Pichia pastoris* ait l'avantage de générer une biomasse importante lors de la fermentation dans du méthanol, les protéines membranaires produites dans *Pichia pastoris* sont souvent difficiles à purifier parce qu'elles ne représentent qu'une petite fraction des protéines totales (Drew *et al.*, 2001).

Pour l'ensemble de ces raisons nous avons effectué tous nos essais dans *Saccharomyces cerevisiae*.

Le système d'expression de *Saccharomyces cerevisiae*, efficace pour les protéines membranaires eucaryotes, a déjà été utilisé par Sekler, Kopito et Casey pour exprimer l'AE1 sauvage (Sekler *et al.*, 1995a).

Nous avons eu recours à trois types de vecteurs d'expression dans la levure pour cloner l'AE1 : un plasmide qui était disponible au laboratoire basé sur un système de surexpression YEpGAL, celui mis au point par le groupe de Joe Casey (Sekler *et al.*, 1995a) et celui mis au point par David Drew (Drew *et al.*, 2008).

Les mutations auxquelles nous nous intéressons génèrent des fuites de sodium et potassium susceptibles de perturber la croissance des levures lorsque la protéine est surexprimée par un vecteur classique. De plus, les inhibiteurs de la bande 3 pouvant être utilisés ne sont pas efficaces sur les mutants présentant de telles fuites de cations. C'est pour cela qu'au laboratoire, plusieurs clones de levures ont été créés en introduisant la bande 3 mutée dans un plasmide YEpGAL inducible en milieu YEP galactose, en collaboration avec Isabelle Mus-Veteau (IPMC, CNRS-UMR 7275, Valbonne)

Le clone 115.2 est une lignée créée à partir de la souche *Saccharomyces cerevisiae* K699 transformée avec un plasmide YEpGAL contenant le gène codant pour le mutant L687P de l'AE1. Nous avons choisi d'étudier ce clone en particulier car les levures transformées avec l'AE1 porteur de cette mutation avaient une bonne croissance en milieu de culture standard.

3.5.2 Expression membranaire de l'AE1 dans le plasmide YEpGAL.

La figure 28 montre deux immunoblots révélant des préparations de membrane de levures *Saccharomyces cerevisiae* exprimant ou non l'AE1. Les levures K699 sont les levures contrôles n'exprimant pas l'échangeur anionique. Les préparations membranaires sont effectuées lorsque la D.O._{600nm} des cultures atteint soit 1 unité soit 5 unités pour chaque souche et condition de culture.

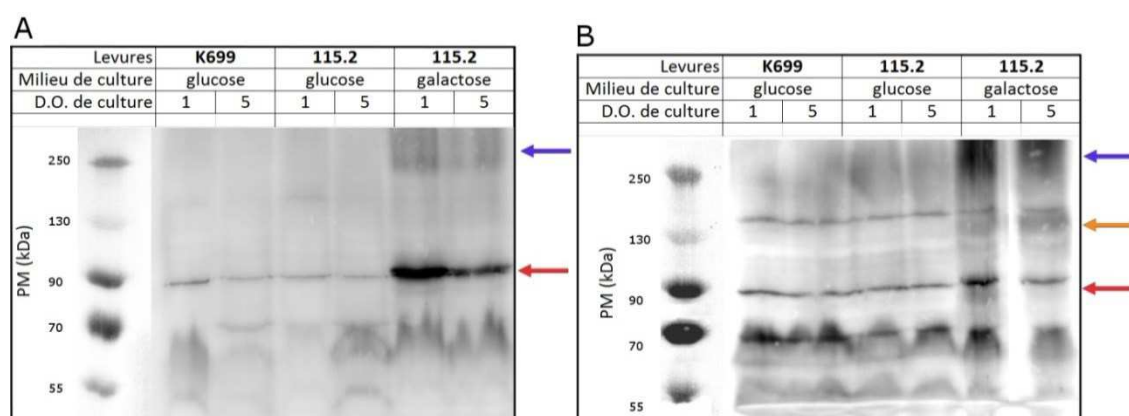


Figure 28. Expression de l'AE1 dans *S. cerevisiae*.

Les Western blots révèlent des échantillons réalisés à partir de préparation de membranes de levures *Saccharomyces cerevisiae* avec des anticorps dirigées contre l'AE1.

Le western-blot (A) est réalisé à partir de préparations de membranes plasmiques et le western-blot (B) a partir de membranes totales. Les flèches représentent la position théorique de l'AE1 non glycosylée (←) et glycosylée (←) et des dimères de la bande 3 (←)

Lorsque l'expression de l'AE1 muté L687P est induite en milieu galactose il y a apparition d'une bande à 95 kDa, correspondant au poids moléculaire de l'AE1 non-glycosylée, symbolisé sur le western blot par une flèche rouge (←) pistes 6 et 7 (figure 28A). A des poids moléculaires supérieurs à 250 kDa on note l'apparition d'un signal caractéristique de dimères de la bande 3 (←).

Cette large bande de protéines est plus visible sur les extraits membranaires totaux figure 28B. De plus les extraits totaux permettent de voir l'apparition d'un signal vers 130 kDa (←) mettant en évidence l'existence de l'AE1-L687P sous forme glycosylée dans la levure.

Nous avons donc pu déterminer que : l'expression de l'AE1-L687P sans induction par le galactose n'était pas détectable. Les bandes à 95 kDa, 130 kDa et d'agrégat ne sont pas détectées lorsque le clone 115.2 est cultivé exclusivement en milieu YEP glucose (pistes 4 et 5) ou lorsque les levures contrôles K699 sont testées en milieu YEP glucose (pistes 2 et 3).

Il existe aussi des différences entre les préparations faites lorsque les solutions de levure étaient à $D.O_{600nm} = 1$ ou $D.O_{600nm} = 5$. En effet à $D.O_{600nm} = 5$ le signal représentant l'AE1 monomérique diminue au profit du signal de l'AE1 polymérique. Nous pouvons supposer que le temps suffisant aux levures pour atteindre la $D.O_{600nm} = 5$ est suffisante pour saturer la membrane en AE1 et que le reste de l'AE1 produit n'est plus exporté à la membrane plasmique.

Le plasmide contenant l'AE1 sauvage ou muté a bien été introduit dans la levure. La production de la protéine était bien effective au moment de la décongélation des levures. Cependant au fil des réensemencements des levures en culture, ces dernières ont tendance à se « débarrasser » de l'AE1 (figure 29). Il n'est plus possible de détecter la protéine à la membrane des levures au bout d'un certain nombre de division. En revanche, la protéine reste détectable encore un certain temps lorsqu'on vérifie sa présence dans la cellule entière ce qui laisse à penser que la protéine est toujours produite mais que la levure a mis en place un mécanisme l'empêchant de terminer son export jusqu'au niveau de la membrane plasmique.

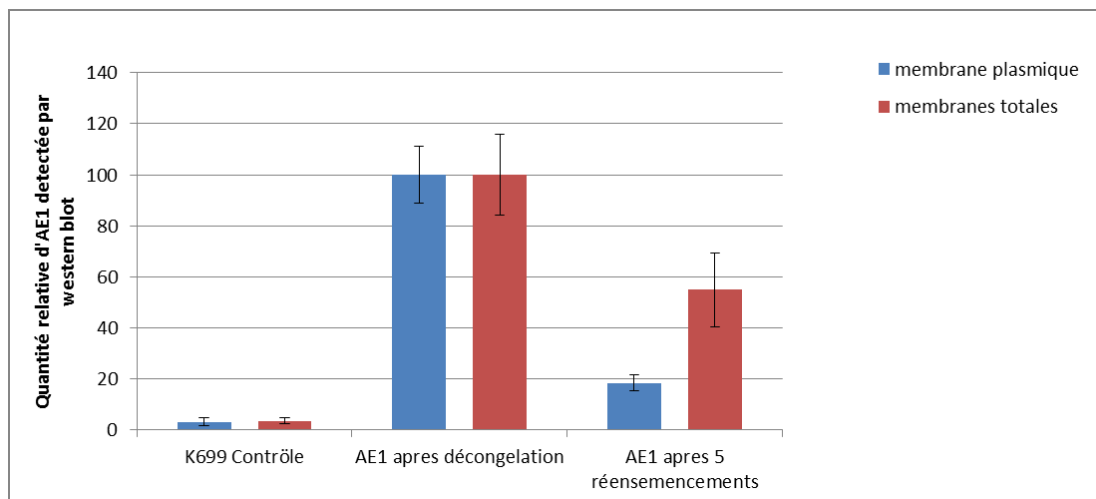


Figure 29 : Perte de l'AE1-L687P au fil des réensemencements.

Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'AE1 détecté par western blot avant le premier réensemencement à D.O._{600nm}=5 (barres centrales).

L'objectif de la production en levure est d'obtenir des protéines fonctionnelles en quantité suffisante. La meilleure manière de vérifier qu'une protéine est toujours fonctionnelle est de mesurer son activité. Cependant, les formes polymériques de l'AE1 détectables uniquement lors de préparation de membranes totales, sont absentes des membranes plasmiques et n'ont donc pas d'activité mesurable dans la levure. La seule activité potentiellement mesurable est celle de la faible proportion de protéines présentes à la membrane plasmique. En conséquence, l'activité que l'on pourrait mesurer dans ces levures ne sera absolument pas le reflet de l'ensemble des AE1 produites par la levure, cela rend impossible l'évaluation de l'état de la majorité des AE1 contenus dans les levures. De plus, le passage des clones en milieu de culture YEP galactose permettant l'expression de l'AE1 fait augmenter la durée de doublement de la population d'un facteur deux à trois.

Ces observations vont à l'encontre d'une production à grande échelle de la protéine dans la levure et des objectifs qualitatifs que nous avons fixés.

Ces résultats sont le reflet de ce que l'on peut observer dans la littérature avec la levure *Pichia pastoris*. Pour contourner ce problème, nous avons essayé de produire l'AE1 avec d'autres vecteurs d'expression et à partir d'une protéine tronquée ne représentant que la partie membranaire de l'AE1.

3.5.3 Expression de l'AE1 dans les plasmides pDDGFP-AE1 et pB1-MDhAE1.

Nous avons testé deux autres plasmides pour essayer de contourner les difficultés d'expression de l'AE1 que nous avons rencontrés avec le plasmide YEpGal dans K699. Pour ces nouveaux essais nous utilisons un AE1 tronqué dans sa partie N-terminale.

Nous avons cloné le mutant S731P et l'AE1 sauvage dans un plasmide pDDGFP-2 (voir « matériel et méthodes » (Newstead *et al.*, 2007, Drew *et al.*, 2008)). La version de l'AE1 que nous avons cloné dans ce vecteur est une partie membranaire de l'AE1. Ce vecteur couplé à la GFP permet de visualiser facilement la production de la protéine d'intérêt. Nous avons introduit dans ce plasmide la partie membranaire de l'AE1 sauvage ou un AE1 muté S731P.

Les clones ont été sélectionnés en fonction de la quantité de GFP produite. Pour chaque mutant de l'AE1, un clone a été sélectionné pour tester la présence d'AE1 à la membrane sur des préparations de membranes plasmiques. La quantité relative de chaque protéine a été déterminée par western-blot en fonction de la quantité de protéines totales déposées (figure 30).

Nous avons normalisé nos résultats en fonction de la quantité de protéine que nous avons utilisée pour chaque dépôt, déterminée grâce à la technique de Bradford. Cette figure montre que nous avons bien une expression membranaire de l'AE1 sauvage ou de l'AE1 S731P en utilisant les protocoles de production décrit par Drew (Drew *et al.*, 2008).

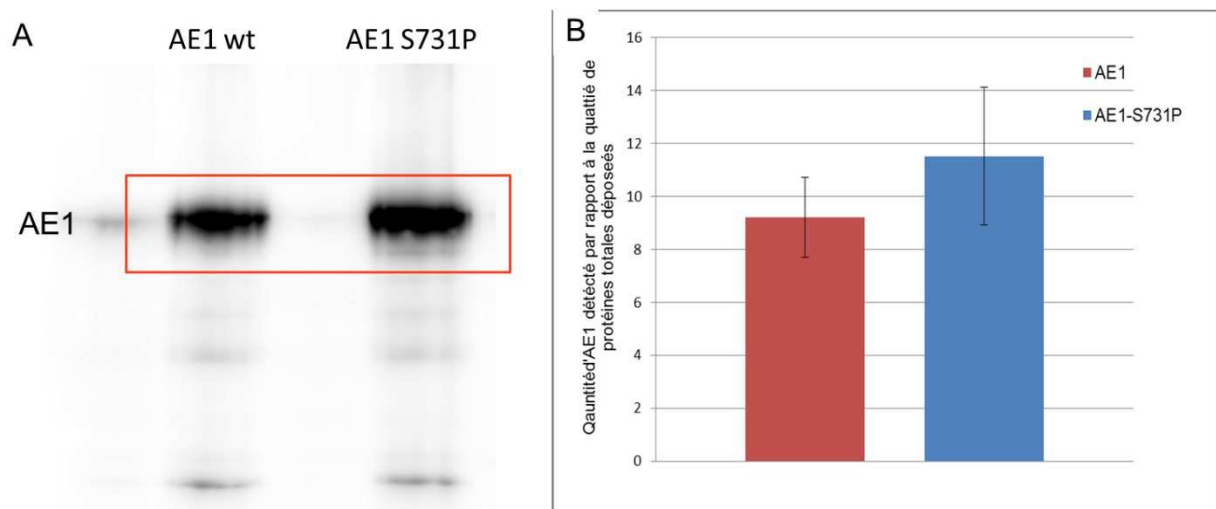


Figure 30. Expression de l'AE1-GFP dans la levure.

- (A) Western blot réalisés à partir de préparation de membranes de levures *Saccharomyces cerevisiae* exprimant l'AE1 sauvage (AE1 wt) ou l'AE1-S731P.
 (B) Quantification de n=5 western blots différents, normalisés par rapport à la quantité de protéines déposées dans chaque ligne (u.a. moyennes ± sem).

Le second plasmide utilisé, le plasmide pB1-MDhAE1 utilisé par l'équipe de J. Casey (Sekler *et al.*, 1995a), contient la région 183-911 de l'AE1 humain. Cette construction a permis à l'équipe de Joe Casey de produire efficacement de l'AE1 dans la levure. Nous avons donc choisi

d'utiliser ce plasmide et introduit la mutation ponctuelle G701C dans pB1-MDhAE1 par coupure-ligation, comme décrit dans la partie « matériel et méthodes », pour comparer avec les constructions que nous avons déjà au laboratoire.

La figure 31 montre l'expression de l'AE1, dans la levure grâce à cette méthode. Nous avons pu constater que l'expression obtenue en transfectant le plasmide fourni par JR Casey et notre plasmide muté avaient les mêmes niveaux d'expression, dans les mêmes conditions de culture dans la levure.

Au départ de cette procédure les dernières données publiées par T. Yamaguchi proposant une structure de l'AE1 basée sur un cristal basse résolution de la partie membranaire de l'AE1 (Yamaguchi *et al.*, 2010a) et l'étude de Pamela Bonar (Bonar *et al.*, 2013) qui propose un modèle basé sur une comparaison avec le canal CIC n'étaient pas encore disponibles.

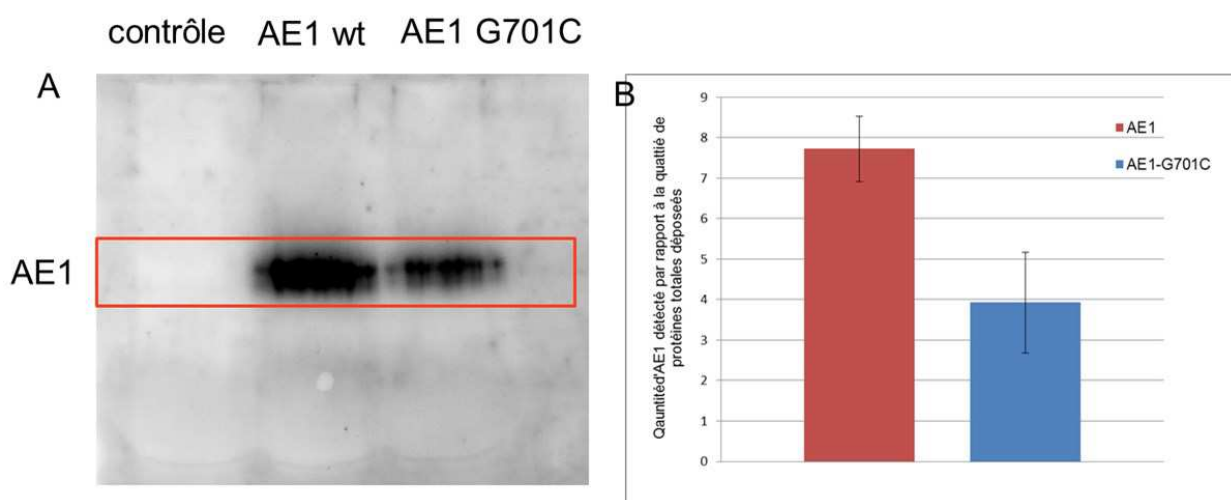


Figure 31 Expression de l'AE1 grâce au vecteur pB1-MDhAE1.

- (A) Western blot réalisés à partir de préparation de membranes de levures *Saccharomyces cerevisiae* exprimant l'AE1 sauvage (AE1 wt) ou l'AE1-G701C. L'échantillon contrôle est un échantillon de levures n'ayant pas reçu le plasmide codant pour l'AE1.
- (B) Quantification de n=5 western blots différents, normalisés par rapport à la quantité de protéines déposées dans chaque ligne (u.a. moyennes ± sem).

L'utilisation de « ghosts » (membranes de globules rouge purifiées) par Yamaguchi a permis à son équipe de proposer un cristal de la partie membranaire de l'AE1 avec une résolution de 18 Å. Ces résultats ont permis de déterminer que des dimères d'AE1 de son cristal ont une dimension de 60 × 110 Å pour une épaisseur 70 Å au niveau de la bicouche lipidique. Ces résultats prometteurs ont montré que la stratégie consistant à utiliser des globules rouges surexprimant déjà l'AE1 apparaissait comme une meilleure stratégie que la surexpression dans la levure. Malgré les premiers résultats obtenus grâce à nos levures nous avons donc décidé de suspendre nos expériences.

3.6 Elaboration d'un modèle tridimensionnel de l'AE1 *in silico*.

Notre compréhension actuelle du transport des ions à travers l'AE1 est principalement basée sur des études biochimiques et de mutagenèse dirigée. Ne disposant pas de structure tridimensionnelle de la partie membranaire de l'AE1, la mutagenèse dirigée reste très aléatoire en terme d'efficacité et fastidieuse pour identifier le rôle des résidus dans les diverses propriétés fonctionnelles de la protéine. Il est également très difficile de déterminer quels sont les segments transmembranaires susceptibles d'interagir les uns avec les autres. Aussi, en collaboration avec le professeur Catherine Etchebest nous avons créé un modèle tridimensionnel du domaine transmembranaire de l'AE1 dont nous avons ensuite évalué la pertinence expérimentalement et par rapport aux données bibliographiques.

3.6.1 Les outils de prédiction.

Bien que différents travaux aient été publiés concernant la topologie du domaine transmembranaire de l'AE1, nous avons soumis cette séquence aux outils de prédiction de topologie disponibles. Lorsque nous avons soumis la partie membranaire de l'AE1 à des outils de prédiction de structure, nous avons constaté d'importantes différences (nombre des segments transmembranaires, délimitation de ces segments, etc.). Malgré ces différences, nous avons pu faire ressortir un certain nombre de points de convergence. Le consensus entre les topologies déterminées à l'aide de ces différents outils est meilleur du côté N-terminal du domaine transmembranaire, c'est-à-dire du résidu 400 au résidu 720. Les outils utilisés prédisent dans la plupart des cas huit hélices transmembranaires mais leur longueur et leur emplacement précis varient selon les outils. La région allant du résidu 720 à la fin est beaucoup plus variable avec un nombre d'hélices alpha allant de une à cinq.

De même, si nous nous intéressons à la disposition des hélices alpha vis-à-vis de la bicouche lipidique et à l'accessibilité de leurs résidus du côté interne ou externe de la membrane les résultats sont peu convaincants. En effet, la plupart des résultats que l'on peut obtenir avec les mêmes données sources donnent des décalages au niveau des positions de départ et d'arrivée des hélices alpha et de segments transmembranaires.

Le manque de consensus pour établir la topologie du domaine transmembranaire de l'AE1 ainsi que l'absence de protéine homologue dans les bases de données de structures tridimensionnelles protéiques nous ont conduits à avoir recours à des outils dédiés tels l-

TASSER (Roy *et al.*, 2010) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) pour prédire une structure 3D du domaine transmembranaire de l'AE1. I-TASSER est une plateforme en ligne permettant de prédire la structure et la fonction de protéines. Les modèles tridimensionnels obtenus par cet outil sont basés sur des combinaisons de méthodes de prédiction. Le protocole d'I-TASSER prévoit plusieurs étapes.

D'abord un « threading », ou enfilage. Il s'agit d'une procédure de bio-informatique permettant d'identifier des protéines modèles, dans des bases de données contenant des structures protéiques résolues, qui possèdent des structures ou des motifs structuraux similaires à la séquence d'intérêt (l'AE1 dans notre cas). Pour cela I-TASSER a recours à des outils préexistants tels :

PSI-BLAST, un outil qui compare des séquences à des bases de données de séquences non-redondantes,

PSIPRED, un outil de prédiction de structures secondaires,

LOMETS (« Local Meta-Threading-Server »), qui prend en compte plusieurs méthodes différentes en les combinant pour obtenir des données de structure tertiaire.

Ces données sont ensuite compilées et classées en fonction de leur « Z-score », qui est un écart mesuré par rapport à une valeur idéale calculée ou une moyenne. Il s'agit donc dans ce cas d'une estimation statistique de leur significativité ou de la pertinence des valeurs présentées.

Par la suite I-TASSER crée avec les données recueillies plusieurs modèles protéiques *ab initio* en assemblant les « meilleurs » fragments modélisés dans la première étape avec les régions non-alignées de la protéine testée (l'AE1). Ces régions dites non-alignées sont principalement des boucles et des suites d'acides aminés qui n'ont pas été pré-modélisées dans la première étape. L'effet direct de cette étape sur l'évaluation de la plausibilité de ces modèles est une baisse globale de leur « Z-score ». Ces modèles *ab initio* sont construits en prenant en compte les données issues de la PDB : l'arrangement des chaînes latérales des acides aminés, les ponts hydrogènes et l'hydrophobicité.

Lors de la troisième étape les résultats obtenus sont resoumis à I-TASSER qui génère des modèles alternatifs. Le but de cette seconde soumission est d'identifier les modèles et les zones qui comportent des conflits stériques, c'est-à-dire des zones où les chaînes latérales sont superposées, pour les éliminer. Les modèles restants sont classés en fonction de leur plus basse énergie et servent de données d'entrée à REMO, qui génère les modèles structuraux finaux. REMO est une procédure permettant d'optimiser les liaisons hydrogènes et l'encombrement stérique des résidus sur les modèles.

La dernière étape est l'annotation des structures identifiables par les bases de données de la PDB des modèles générés. Elle s'effectue au niveau des structures secondaires et tertiaires.

3.6.2 Choix du modèle de l'étude.

Appliqué à la partie transmembranaire de l'AE1, I-TASSER propose 5 modèles avec des scores (« C-scores ») élevés. Les « C-scores » sont basés sur la qualité des alignements et la convergence de l'ensemble des outils utilisés par I-TASSER. Cet outil nous a permis de sortir 5 modèles tridimensionnels avec des scores proches et élevés.

Le premier modèle que nous ayons obtenu est basé sur le cotransporteur sodium/glucose ([PDB : 3DH4](#)). Ce modèle comporte cependant plusieurs défauts incompatibles avec les données que nous avons :

L'extrémité C-terminale est extracellulaire, donc incompatible avec les données publiées dans la littérature.

Les deux lysines 851 et 539 connues pour être les sites de liaison du H₂DIDS, ont des positions respectivement intra et extra cellulaires ce qui empêcherait une fixation du H₂DIDS.

Le modèle numéro 2, basé sur la sous-unité β de l'importine ([PDB : 2P8Q](#)), a lui aussi été écarté parce que sa topologie n'était pas compatible avec la fonction de transport de l'AE1.

Enfin les 3 derniers modèles sont principalement basés sur le transporteur de l'uracile ([PDB: 3QE7](#)). Ils sont assez similaires du début de leur séquence jusqu'au résidu 850, c'est-à-dire sur près de 90% de la séquence proposée à I-TASSER. Nous les avons donc regroupés sur un modèle unique (figure 32).

Lorsqu'on compare la séquence primaire du domaine transmembranaire de l'AE1 érythrocytaire humain avec celle du transporteur de l'uracile nous n'obtenons que 17% seulement de similarité. Cependant, les valeurs E et P (« E and P values ») d'I-TASSER, qui estiment la pertinence de l'alignement, étaient suffisamment importantes pour que nous analysions la fiabilité de ce modèle.

3.6.3 Description et analyse du modèle du domaine transmembranaire de l'AE1.

Le modèle du domaine transmembranaire de l'AE1 présente 14 segments qui traversent la bicouche lipidique, 12 hélices α et deux segments ayant une moitié hélice α et une moitié non structurée (TM3 et TM10) (figure 32). Aucun feuillet β n'a été prédit dans la structure.

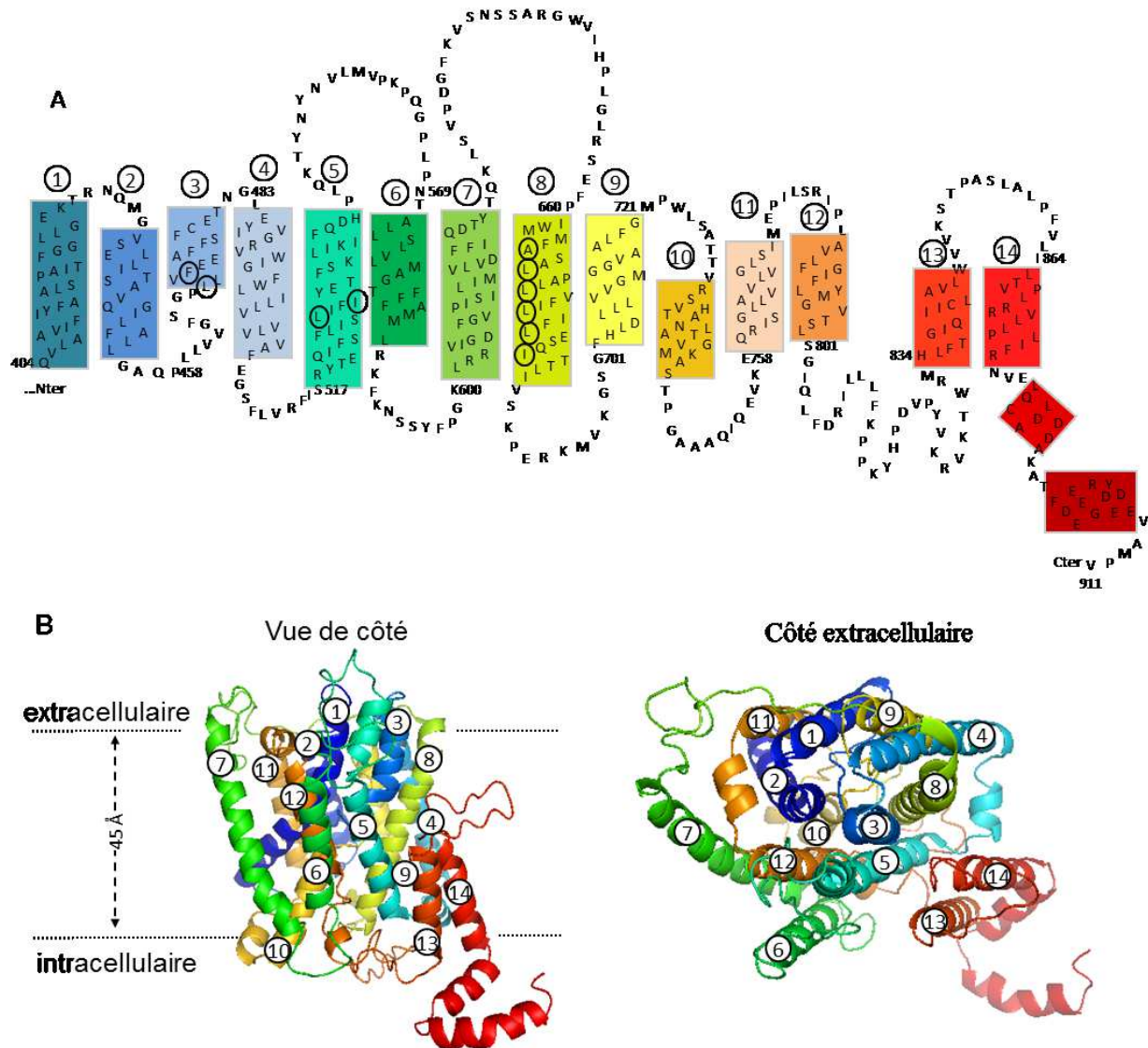


Figure 32. Modèle topologique classique et tridimensionnel de l'AE1.

Cette figure montre en (A) le modèle topologique révisé suite à la modélisation tridimensionnelle et en (B) notre modèle tridimensionnel basé sur le symporteur de l'uracile. Les deux images en partie B ont été obtenues grâce à l'utilisation de PyMOL 0,99rc6 (www.pymol.org).

Sur la figure 33 nous pouvons observer une symétrie entre les segments transmembranaires 4-5 et 11-12. Ils forment deux arcs inversés plus ou moins de même taille. Les parties hélicoïdales du segment transmembranaire 3 (entre TM 4 et 5), et segment transmembranaire 10 (entre TM11 et 12) pointent l'une vers l'autre. Les segments transmembranaires 1, 2 et 9 sont situés dans l'espace délimité par les segments transmembranaires 4-5 et 11-12. Le segment transmembranaire 8 est une hélice alpha longue et inclinée s'étendant à travers cet espace, parallèlement à l'orientation des segments transmembranaires 3 et 10. Les segments

transmembranaires 6-7 et 13-14 sont disposés à la périphérie de la structure. Les segments transmembranaires 1-7 et les segments transmembranaires 8-14 forment alors deux structures antiparallèles (figure 33).

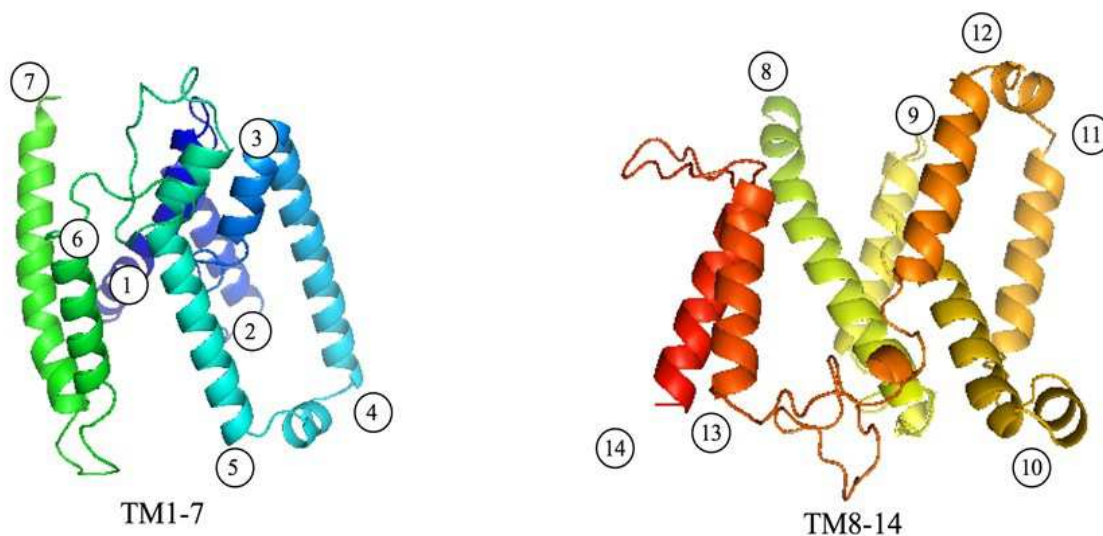


Figure 33. Une symétrie dans l'AE1.

Notre modèle tridimensionnel montre une symétrie entre les TM1-7 et les TM8-14. Nous pouvons noter les 2 « arches » formées par les TM4 et 5 d'une part et les TM 11 et 12 d'autre part.

3.6.4 Validation du modèle tridimensionnel de l'AE1.

Nous avons utilisé un serveur PPM (« Prediction by partial matching » ou prédiction par correspondance partielle) afin de déterminer les limites des segments transmembranaires et les confronter à notre modèle obtenu par I-TASSER (tableau E).

Tableau E. Identification des segments transmembranaires de l'AE1.

Comparaison entre deux outils de prédiction basés sur l'étude de la séquence d'acides aminés de la séquence 405-911 de l'AE1.

Le serveur PPM va permettre d'identifier les acides aminés qui sont positionnés dans la membrane plasmique alors que l'algorithme Stride permet de prédire la formation de structure tertiaire (hélices alpha notamment).

	Segments transmembranaires définis par un serveur PPM.			Hélices alpha identifiées par un algorithme Stride (« <u>Structural identification</u> »)		
	début	fin	nb	début	fin	nb
TM1	405	423	19	405	423	19
TM2	437	455	19	437	454	18
Segment transmembranaire partiel hélicoïdal	458	472	15	465	472	8
TM3	489	508	20	489	507	19
TM4	514	537	24	518	537	20
TM5	575	592	18	575	589	15
TM6	603	624	22	603	624	22
TM7	667	684	18	667	684	18
TM8	701	719	19	702	718	17
Segment transmembranaire non-hélicoïdal	721	735	15			
TM9	759	777	19	759	774	16
TM10	786	804	19	786	800	15
TM11	835	854	20	835	848	14
TM12	857	878	22	865	878	14

Le tableau E met en parallèle un outil de prédiction de topologie en identifiant les segments transmembranaires d'une part et un outil de prédiction de structure tertiaire d'autre part. Ces deux outils ont pour base une séquence d'acides aminés. Lors de la création de ce tableau nous nous sommes servis de la séquence de l'AE1 érythrocytaire.

Les données des deux tableaux se recoupent : les hélices alpha prédites sont positionnées au niveau des segments transmembranaires. En effet, les hélices alpha ont la particularité de placer les acides aminés de manière à ce que leurs chaînes latérales soient orientées vers le solvant alors que la chaîne principale est au centre. La structure en hélice alpha est très favorable pour la création de segments transmembranaires et entre en compte lors de la prédiction des segments transmembranaires. Cependant l'algorithme PPM annonce aussi 2 cas plus particuliers. Les acides aminés $_{721}\text{MPWLSATTVRSVTHA}_{735}$ qui ne sont pas associés à une hélice alpha. Cette séquence est décrite comme une boucle réentrant dans la membrane (Hirai *et al.*, 2011). Les acides aminés $_{458}\text{PLLVGFSPLLVE}_{472}$ forment un segment transmembranaire mixte : seule la partie finale à partir de la sérine 465 est en hélice alpha. Sur notre modèle tridimensionnel (figure 32 et 33) cette séquence correspond au TM3.

Précédemment nous avons montré que le segment transmembranaire 8 faisait partie du site de transport de l'AE1 permettant aussi bien l'échange anionique que la fuite cationique chez certains mutants. Dans le modèle choisi, le segment transmembranaire 8 apparaît comme une longue hélice alpha inclinée. Vue depuis la face externe de la membrane plasmique, une face

du segment transmembranaire 5 suit la courbure du segment transmembranaire 8. De plus, le segment transmembranaire 3 est positionné entre le haut du segment transmembranaire 8 et du segment transmembranaire 5 (figure 32). Nous avons donc voulu vérifier si les segments transmembranaires 3, 5 et 8 pouvaient structurer le site de transport de l'AE1.

Le segment transmembranaire 5 contient une séquence d'acides aminés hautement conservée parmi les échangeurs d'anions SLC4A1, A2 et A3. Il s'agit de la séquence ⁵³²FIYE⁵³⁵ et surtout l'isoleucine 533 qui est présente dans l'ensemble des membres connus de la famille SLC4 (figure 34). Par ailleurs, le segment transmembranaire 5 abrite aussi la lysine 539 qui est une des deux lysines servant de fixation au DIDS. (4,4'-stilbène diisothiocyano-2, 2'-disulfonate). Cette lysine n'est cependant pas directement impliquée dans le site de transport. Il est possible de lier les deux lysines K539 et K850 en y fixant le DIDS de manière covalente. Sur notre modèle les positions respectives de ces deux lysines sont compatibles avec la fixation du H₂DIDS : une distance d'environ 20 angströms entre les 2 lysines, ce qui correspond à la taille du H₂DIDS, et une disposition en vis-à-vis.

AE1	<i>Homo sapiens</i>	QEIFSFLISLIF I YETFS K LIKI
	<i>Equus</i>	QEIFSFLISLIF I YETFS K LVKI
	<i>Rattus</i>	QEIFSFLISLIF I YETFS K LIKI
	<i>Gallus</i>	QEIFSFLISLIF I YETFA K LVTI
	<i>Fugu</i>	QEIFAFLISLIF I YETFS K LIKV
	<i>Danio</i>	QEIFSFLISLIF I YETFS K LLKI
	<i>Oncorhynchus</i>	QEIFSILISLIF I YETFS K LGKI
	<i>Anguilla</i>	QEIFSILISLIF I YETFS K LIKI
	<i>Raja</i>	QEIFSILISLIF I YETFN K LFKI
	<i>Tilapia</i>	QEIFSILISLIF I YETFS K LIKI
AE2	<i>Homo sapiens</i>	REIFAFLISLIF I YETFY K LVKI
	<i>Rattus</i>	QEIFAFLISLIF I YETFY K LIKI
	<i>Gallus</i>	QEIFAFLISLIF I YETFS K LGKI
	<i>Fugu</i>	QEIFSFLISLIF I CETFI K LGRP
	<i>Raja</i>	QEIFAFLIS I LIF I YETFY K LVKI
AE3	<i>Homo sapiens</i>	QEIFAFLISLIF I YETFY K LYKV
	<i>Rattus</i>	QEIFAFLISLIF I YETFH K LYKV
	<i>Gallus</i>	QEIFAFLISLIF I YETFY K LYKV
	<i>Fugu</i>	QEIFAFLISLIF I YETFS K LVKV
	<i>Raja</i>	QEIFAFLIS A LIF I YETFK N LLIV
AE	<i>Drosophila</i>	QEIFSALITL I Y I VETVM K LLSV
	<i>Anophèle</i>	QEIFSALITL L F I FETSI K LVS

Figure 33. Alignement des séquences correspondant au TM5 de l'AE1 humain avec l'AE2, l'AE3 ou l'AE (Drosophila et Anophèle).

Les acides aminés leucine 530, isoleucine 533 et lysine 539 de l'AE1 humain sont notés en gras et en couleur de la même manière que acides aminés correspondants dans les séquences suivantes.

Le segment transmembranaire 3 possède lui aussi une séquence conservée : ⁴⁶³GFSGPL₄₆₈. Cette séquence est conservée dans les SLC4A1, A2 et A3 des vertébrés. Cette séquence devrait être accessible, au moins partiellement, au solvant d'après notre modèle.

3.6.4.1 Mutagenèse dans les segments transmembranaires 3 et 5.

Pour déterminer le rôle des segments transmembranaires 3 et 5 dans l'activité de transport AE1 et valider notre modèle tridimensionnel, nous avons une nouvelle fois procédé à un criblage par mutagenèse cystéine associée à un marquage par réactif sulfhydryle. Le double avantage de cette méthode est de permettre à la fois de valider l'accessibilité au solvant des chaînes latérales des résidus mutés et de donner des informations sur le mécanisme de fonctionnement de la protéine.

Nous avons choisi des positions qui selon notre modèle devaient être accessibles au milieu extra ou intra cellulaire. Nous avons muté en cystéine les résidus sérine 525, phénylalanine 526, isoleucine 528, sérine 529, leucine 530, phénylalanine 532, isoleucine 533, tyrosine 534, acide glutamique 535, phénylalanine 537, lysine 539, leucine 540, isoleucine 541, lysine 542 du segment transmembranaire 5. Une approche similaire a été utilisée pour étudier l'implication du segment transmembranaire 3, en mutant les résidus sérine 465, leucine 468, phénylalanine 471, acide glutamique 472 et 473, et phénylalanine 475. Dans notre modèle, la sérine 465 occupe une position stratégique au centre de la bicouche lipidique. De plus, il a été proposé que cette sérine 465 puisse jouer, dans l'AE1, le rôle de la sérine de la séquence consensus GSGIP des canaux chlorures qui est un des sites de fixation du chlorure (Hirai *et al.*, 2011). Nous avons donc effectué une étude un peu plus poussée sur cette sérine 465. Elle a été remplacée par une cystéine, une isoleucine ou une alanine. Les autres acides aminés listés ont été remplacés par des cystéines uniquement.

3.6.4.2 Expression des mutants des segments transmembranaires 3 et 5.

Tous les mutants ont été exprimés dans des ovocytes de xénope et leur adressage correct à la membrane plasmique de l'ovocyte a été vérifié par immunodétection de l'AE1, à partir d'échantillons de membrane d'ovocytes biotinylés (figure 35).

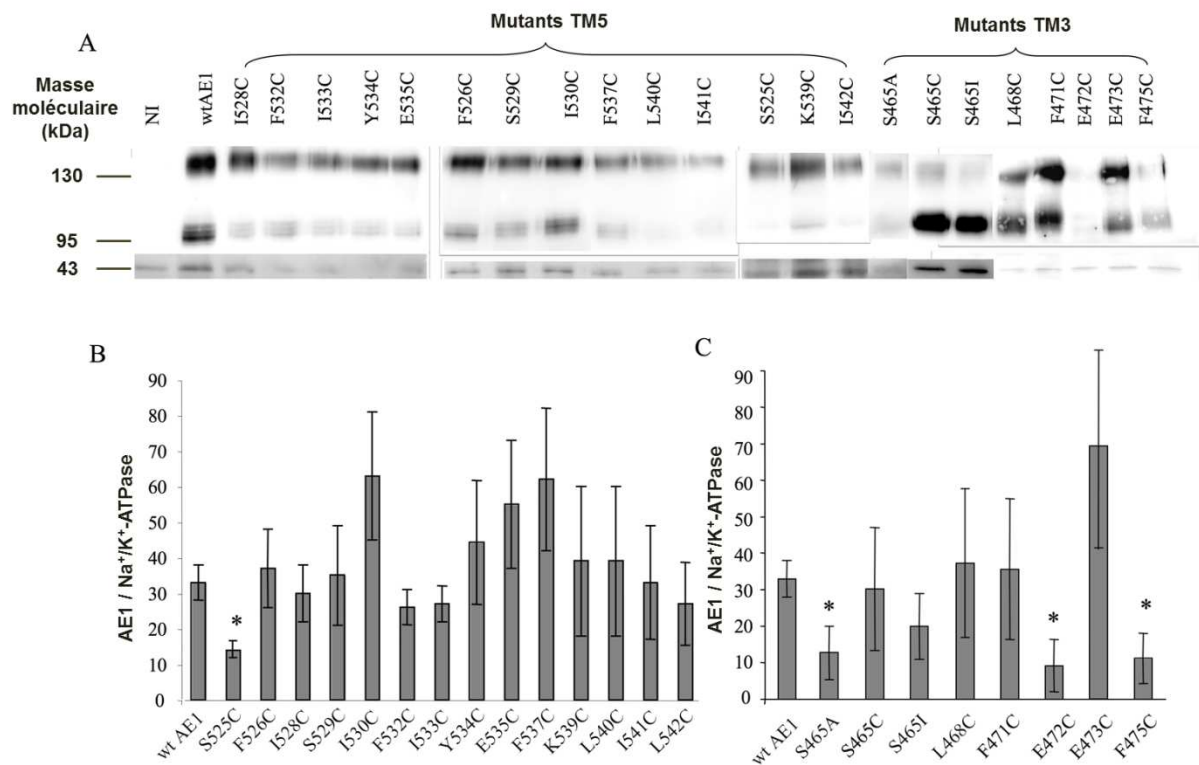


Figure 35. Expression membranaire des mutants ponctuels des segments transmembranaires 3 et 5 de l'AE1.
 (A) Immunoblots de membranes d'ovocytes biotinylées exprimant les mutants de l'AE1, révélés avec des anticorps dirigés contre l'AE1 (partie du haut) ou la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+/K^+ ATPase (partie du bas). (B) et (C) sont les quantifications des immunoblots obtenus pour les mutants des TM 3 et 5. (* student $p < 0,05$).

La variation du niveau d'expression d'AE1 à la membrane plasmique est importante, comme en témoigne la taille des barres d'erreur. Ces variations s'expliquent par deux facteurs. Le premier est expérimental : on relève d'importantes variations de la détection entre les différents lots d'ovocytes pour un même mutant injecté. Le second est dû à la méthode de calcul: les moyennes sont calculées à partir du rapport de la chimioluminescence associée à l'AE1 surexprimé sur la chimioluminescence associée à la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+/K^+ ATPase endogène. Le niveau d'expression et de détection de ces deux protéines est très différent, aussi, de petites variations du signal Na^+/K^+ ATPase entraînent d'importantes variations du rapport final. Ainsi, il est impossible de déduire des différences d'expression statistiquement significatives entre les mutants et l'AE1 sauvage à partir de ces western-blots. Les seules différences significatives que nous ayons relevées concernent les mutants S525C (segment transmembranaire 5), S465A, E472C et F475C (segment transmembranaire 3). Tous ces mutants sont beaucoup moins exprimés que l'AE1 sauvage dans toutes les expériences. Néanmoins leur niveau d'expression membranaire reste compatible avec des mesures fonctionnelles sur ces mutants.

3.6.4.3 Propriétés de transport des mutants du segment transmembranaire 5.

Comme pour le segment transmembranaire 8, nous avons mesuré 3 facteurs différents : l'activité d'échange d'anions, la variation des contenus des ovocytes en sodium et potassium et l'influx de lithium. Ceci a été réalisé dans des ovocytes injectés avec de l'ARN codant pour de l'AE1 sauvage ou portant l'une des mutations citées précédemment, à t=3 jours après injection.

3.6.4.3.1 Mesure de l'échange d'anion des mutants du segment transmembranaire 5.

L'échange d'anions au travers de l'AE1 sauvage ou muté est présenté figure 36.

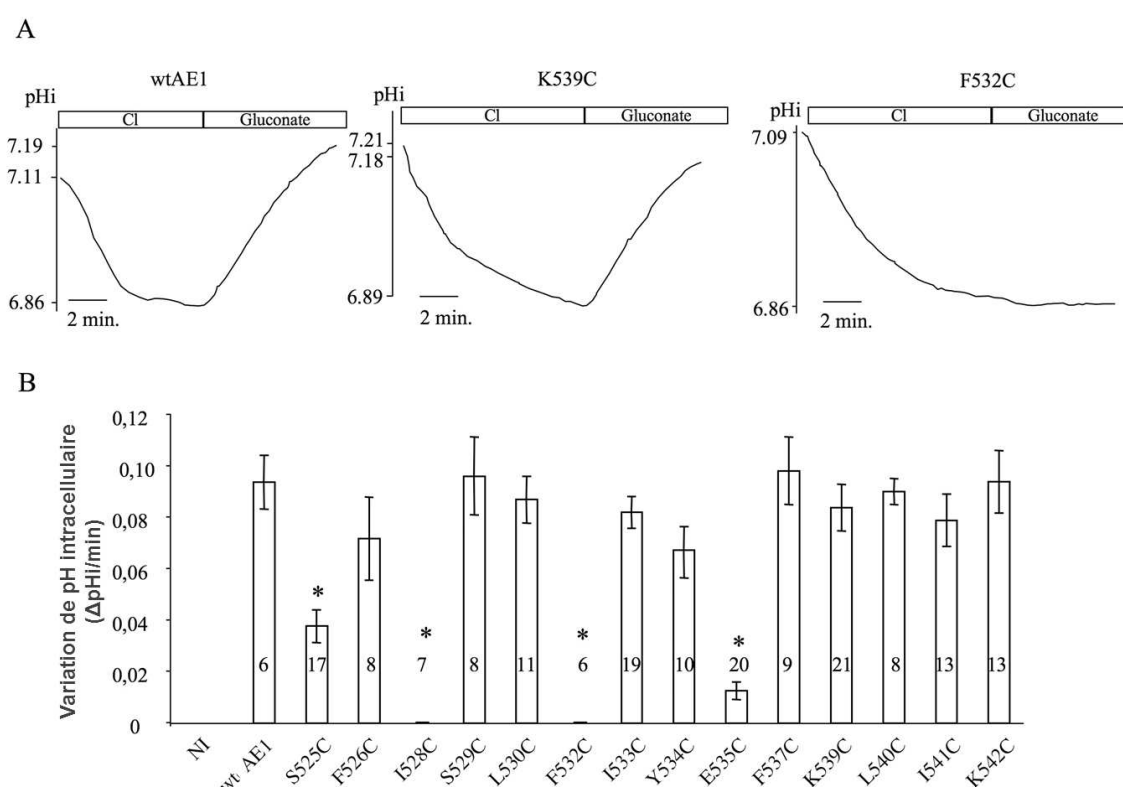


Figure 36. Echange d'anions de la protéine sauvage AE1 et des mutants cystéine du segment transmembranaire 5.

(A) Enregistrements représentatifs de la mesure du pH_i (pH intracellulaire) de l'AE1 sauvage (panneau de gauche), du mutant K539C (panneau central) et du mutant F532C (panneau de droite). Chacune des traces provient d'une expérience différente réalisée avec des électrodes sensible au pH différentes.

(B) Variations du pH_i après acidification des ovocytes en milieu CO₂/HCO₃⁻. Résultats exprimés en variation de pH par minute en fonction du mutant de l'AE1 mesuré. Les résultats sont des moyennes ± s.e.m. (erreur standard sur la moyenne) de n (nombre noté sur les barres) ovocytes provenant de différents lots. (* test t de Student, p≤0,05)

La figure 36A est une représentation des enregistrements types obtenus avec des ovocytes exprimant l'AE1 sauvage ou un mutant du segment transmembranaire 5. Sur cette figure les

trois enregistrements ont été obtenus avec des lots d'ovocytes et des pipettes d'enregistrement différents. Ces trois enregistrements sont représentatifs des phénotypes observés lors des mesures : une première phase d'acidification en milieu contenant de chlorure (partie notée Cl sur le graphique) et une seconde phase d'alcalinisation en milieu gluconate sans chlorure. La mesure est effectuée lors de la phase initiale d'alcalinisation.

- Le tracé de gauche, AE1 sauvage avec activité d'échange normale.
- Le tracé central, mutant cystéine ayant conservé son activité de transport intacte.
- Le tracé de droite, mutant cystéine ayant perdu sa capacité d'échange chlorure/bicarbonate.

L'histogramme figure 36B regroupe les variations moyennes du pH_i , obtenues comme décrit dans la partie matériel et méthodes, de plusieurs ovocytes exprimant l'AE1 sauvage ou muté lors des mesures. La majorité des mutants sont fonctionnels, capables d'échanger chlorure et bicarbonate à l'exception de I528C, F532C et E535C. Pour ces trois mutants, la perte ou la forte réduction de la capacité d'échange d'anions n'est pas due à un défaut d'expression de la protéine dans la membrane plasmique de l'ovocyte (figure 35B). Seul le mutant S525C présente une activité d'échange d'anions réduite corrélée à un taux d'expression de la protéine plus faible que l'AE1 sauvage. Dans ce cas on peut supposer que la mutation S525C n'altère pas la fonction de transport de la protéine, mais plutôt la quantité de protéines à la membrane plasmique.

3.6.4.3.2 Mesure de la perméabilité au sodium et au potassium des mutants du segment transmembranaire 5.

Nous avons vérifié si les mutations du segment transmembranaire 5 induisaient ou non une perméabilité cationique. Les résultats présentés en figure 37A sont des différences par rapport à des ovocytes non-injectés des contenus en sodium ou potassium.

La condition contrôle est la mesure effectuée sur les ovocytes non-injectés. Si on moyenne sur plusieurs expériences et plusieurs lots d'ovocytes différents on obtient les valeurs basales suivantes :

- $[\text{Na}^+] = 50,1 \pm 4,5 \text{ } \mu\text{mol/g de poids sec, } n=14,$
- et $[\text{K}^+] = 59,2 \pm 5,5 \text{ } \mu\text{mol/g de poids sec, } n=14.$

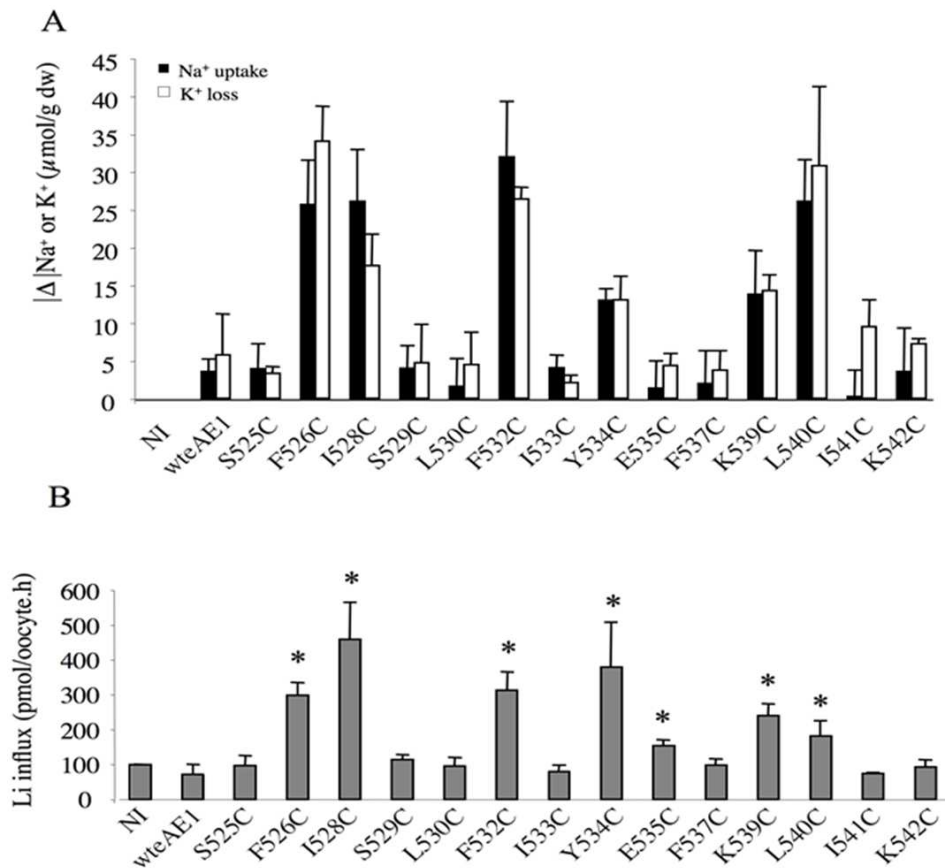


Figure 37. Perméabilité aux cations des ovocytes exprimant l'AE1 sauvage ou portant une mutation dans le segment transmembranaire 5 de l'AE1.

(A). Variations en sodium et potassium entre les ovocytes non-injectés, les ovocytes exprimant l'AE1 sauvage et les ovocytes exprimant le mutant de l'AE1. Les valeurs absolues de ces variations sont moyennées et reportées dans le graphique. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de poids sec \pm s.e.m., par rapport à la condition contrôle (ovocytes non-injectés, notés NI).

(B) Influx de lithium dans des ovocytes non-injectés, exprimant l'AE1 sauvage ou l'AE1 portant une mutation cystéine du segment transmembranaire 5. L'influx de lithium est normalisé par rapport aux ovocytes non-injectés (NI) pour chaque expérience et ensuite moyenné pour chaque mutant. La valeur représentée est le pourcentage de la valeur relevée pour les ovocytes non-injectés \pm s.e.m. pour 3 à 7 différents lots d'ovocytes. (*test t de Student avec $p \leq 0,05$).

Par commodité, les résultats sont exprimés en valeurs absolues mais dans la réalité le flux net de sodium est entrant alors que le flux net de potassium est sortant. La variation de potassium est donc une diminution de la concentration interne en potassium et devrait avoir une valeur négative sans l'utilisation de la valeur absolue.

Nous pouvons observer sur cette figure 37A que les mutants F526C, I528C, F532C, Y534C, K539C et L540C se distinguent nettement de l'AE1 sauvage. Nous avons relevé sur ces ovocytes une augmentation significative de la teneur en sodium corrélée à une diminution significative de la teneur en potassium. Compte tenu des erreurs qui s'accumulent lors de la manipulation des échantillons, nous avons considéré que les variations inférieures à $10 \mu\text{mol/g}$ de poids sec n'étaient pas significatives.

Pour confirmer la faible fuite de cations pour les mutants Y534C et K539C, nous avons augmenté de deux jours la durée d'incubation des ovocytes avant de mesurer le contenu en

ions. En passant la durée d'incubation de 3 à 5 jours, nous avons obtenu les résultats suivants (en $\mu\text{mol/g}$ de poids sec par rapport aux ovocytes non-injectés) :

- Pour le mutant Y534C, $\Delta[\text{Na}^+] = 26,6 \pm 8,6$ et $\Delta[\text{K}^+] = -21,1 \pm 4,5$ (respectivement $13,8 \pm 1,3$ et $-13,0 \pm 2,5$ à 3 jours).
- Pour le mutant K539C, $\Delta[\text{Na}^+] = 22,8 \pm 6,3$ et $\Delta[\text{K}^+] = -27,6 \pm 5,7$ (respectivement $14,0 \pm 4,8$ et $-13,9 \pm 2,0$ à 3 jours).

Le mutant E535C n'effectuant plus d'échange chlorure/bicarbonate a aussi été testé à 5 jours. Les variations de la teneur en sodium et potassium sont, dans ce cas, restées stables et sans différence significative par rapport aux mesures faites sur les ovocytes non-injectés ou exprimant l'AE1 sauvage.

3.6.4.3.3 Mesure de la perméabilité au lithium des mutants du segment transmembranaire 5.

La perméabilité au lithium a aussi été mesurée pour ces mêmes mutants du segment transmembranaire 5 (figure 37B). Tous les ovocytes exprimant les mutants capables de faire passer des ions sodium et potassium que nous avons identifiés précédemment, présentent un influx de lithium significativement supérieur à celui d'ovocytes non-injectés ou exprimant l'AE1 sauvage. L'influx de lithium mesuré dans des ovocytes exprimant E535C était légèrement au-dessus du contrôle, cependant cette faible augmentation de la perméabilité au lithium n'a pas été associée à des changements dans les contenus en sodium et potassium.

Si on compare les résultats obtenus en mesure de contenus sodium/potassium et lithium nous pouvons constater une corrélation entre la perméabilité au lithium et les flux nets de sodium et potassium. Ce type de résultats a déjà été vu lors de l'étude du segment transmembranaire 8.

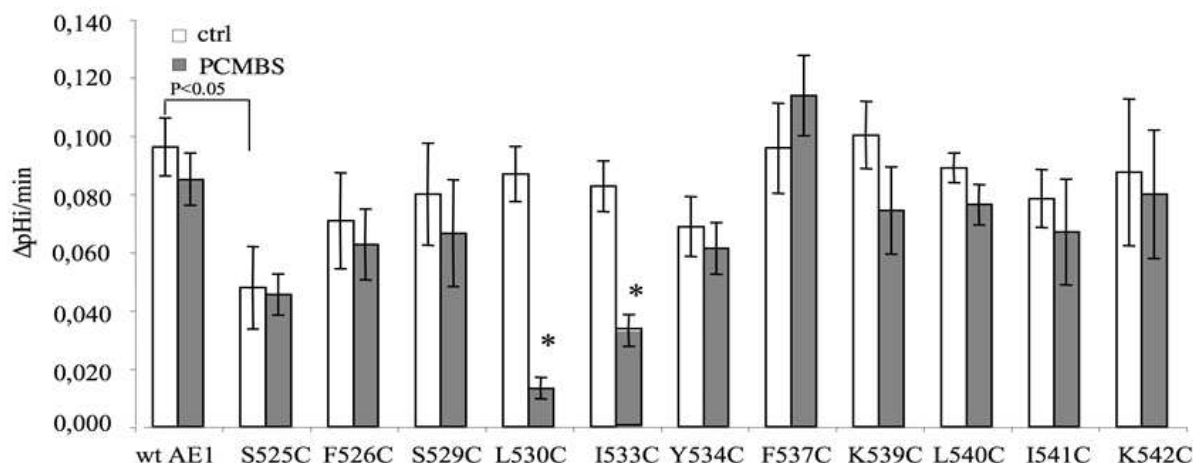
3.6.4.3.4 Accessibilité des cystéines du segment transmembranaire 5.

Pour estimer la position des acides aminés mutés en cystéine dans notre modèle tridimensionnel, nous avons évalué leur accessibilité au solvant. Pour cela nous avons mesuré l'activité d'échange d'anions et l'activité de transport de cations (quand on l'observe) après la liaison des réactifs thiols de tailles et de charges différentes: MTSEA (cationique/neutre: 1 pour 10 à pH 7,5), MTSET (cationique), MTSES (anionique) et PCMB (anionique).

Seuls les mutants dont la chaîne latérale est accessible au milieu aqueux devraient voir leur activité d'échange d'anions et/ou leur activité de transport de cations modifiée en présence de ces réactifs thiols si les mutations affectent des résidus impliqués dans l'activité de transport. Les données sont illustrées figure 38A. Nous pouvons observer que les réactifs testés n'ont pratiquement pas d'effet sur l'échange chlorure/bicarbonate des mutants cystéine sauf les 2

mutations L530C et I533C qui rendent l'AE1 sensible au PCMBs à 1 mM. Pour ces deux cas, l'inhibition observée est respectivement de 80% et 70% par rapport à leur contrôle.

A



B

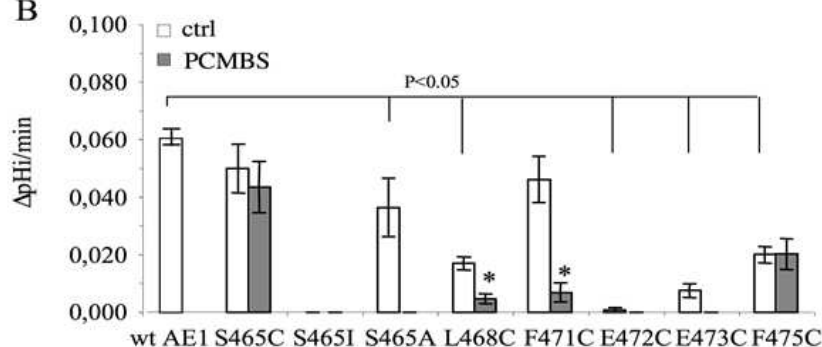


Figure 38. Mesure de l'échange chlorure/bicarbonate des mutants des segments transmembranaires 3 et 5.

(A) Mutants du TM 5 et (B) mutants du TM 3, avec ou sans PCMBs 1mM.

Les mutations ponctuelles S465I et S465A n'ont pas été testées avec PCMBs étant dépourvues de cystéine à l'endroit de la mutation, de même pour l'AE1 wt dans la partie (B) de la figure, l'AE1 sauvage n'a pas été retesté en PCMBs car nous avons vu que le PCMBs n'avait pas d'effet sur ce dernier lors des essais avec les mutants du TM5 (partie A de la figure). (*test t de Student, $p \leq 0,05$).

3.6.4.4 Propriétés de transport des mutants du segment transmembranaire 3.

3.6.4.4.1 Mesure de l'échange d'anion des mutants du segment transmembranaire 3.

La figure 38B, barres blanches, représente l'activité d'échange d'anions des mutants cystéine du segment transmembranaire 3. Les mutations cystéines ont des effets plus ou moins importants sur la capacité de l'échangeur à échanger des anions : les cystéines en position 465 et 471 ne semblent pratiquement pas affecter le transport alors que les deux mutations L468C et F475C ont pour effet de diminuer fortement cet échange (environ un tiers du contrôle

effectué avec de l'AE1 sauvage). Enfin, les mutations E472C et E473C affectent beaucoup l'échange d'anions qui devient difficilement mesurable sur les ovocytes.

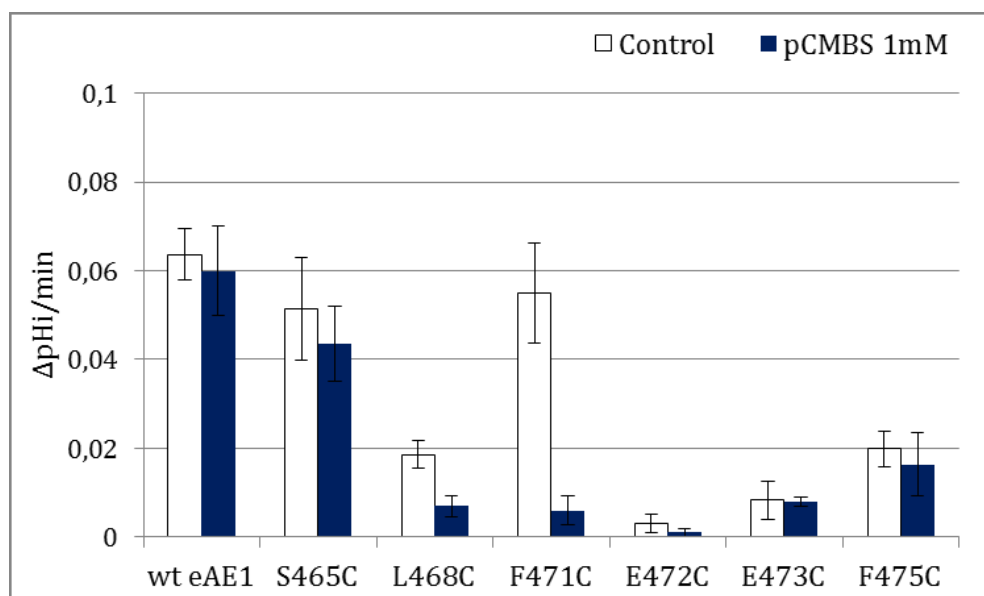


Figure 39. Mesure des variations du pH intracellulaire des mutants du segment transmembranaire 3.
Les mesures ont été réalisées avec ou sans incubation préalable avec du pCMBS 1mM.

Aucune substitution sur le segment transmembranaire 3 n'a provoqué de fuite de cations (évaluée par la teneur en cations après 3 jours en MBS avec ouabaine et bumétanide).

3.6.4.4.2 Accessibilité des cystéines du segment transmembranaire 3.

Dans notre modèle tridimensionnel les mutations que nous avons effectuées placent les chaînes latérales des acides aminés mutés à l'intérieur de la lumière du pore. Elles devraient être accessibles au solvant côté extracellulaire de la protéine.

Pour vérifier notre hypothèse nous avons mesuré les caractéristiques d'échange de ces mutants cystéine de l'AE1 en présence ou en absence de réactifs sulfhydryle. Ces résultats sont reportés sur la figure 39. Le PCMBBS à 1 mM n'a pas d'effet notable sur les mutants cystéine S465C, E472C S473C et F475C ni sur l'AE1 sauvage. Au contraire, nous observons une nette diminution de cet échange chlorure/bicarbonate pour les mutants L468C et F471C. Le PCMBBS appliqué sur des ovocytes exprimant l'un de ces deux mutants réduit l'échange d'anions respectivement de 63% et de 89% par rapport à la condition sans PCMBBS. Ces résultats montrent que :

- Ces positions sont bien accessibles au solvant
- La chaîne latérale de ces résidus se situe au niveau du site de passage des anions de l'AE1.

3.6.4.5 Implication des TM5 et TM3 dans la fuite de cation du mutant H734R.

Dans le chapitre précédent nous avons montré qu'en plus du segment transmembranaire 8, les segments transmembranaires 3 et 5 faisaient aussi partie du site d'échange d'anions de l'AE1 sauvage. Nous avons donc voulu vérifier si les segments transmembranaires 3 et 5 faisaient aussi partie du site de passage des cations.

Pour cela, nous avons effectué les mutations cystéines dans les segments transmembranaires 3 ou 5 sur l'AE1-H734R perméable aux cations. Nous avons effectué ces mutations par coupure et ligation comme décrit dans la section « matériel et méthodes ».

3.6.4.5.1 Mesure de la perméabilité au lithium des mutants H734R-Cys sur segment transmembranaire 5 ou 3.

Les doubles mutants nouvellement créés sont les suivants :

- Segment transmembranaire 5 : H734R-S525C; H734R-F526C; H734R-S529C; H734R-L530C; H734R-I533C; H734R-E535C; H734R-F537C; H734R-L540C; H734R-I541C; H734R-K542C.
- Segment transmembranaire 3 : H734R-S465C/I/A, H734R-L468C et H734R-F471C.

Nous avons mesuré la perméabilité au lithium des ovocytes exprimant ces diverses constructions.

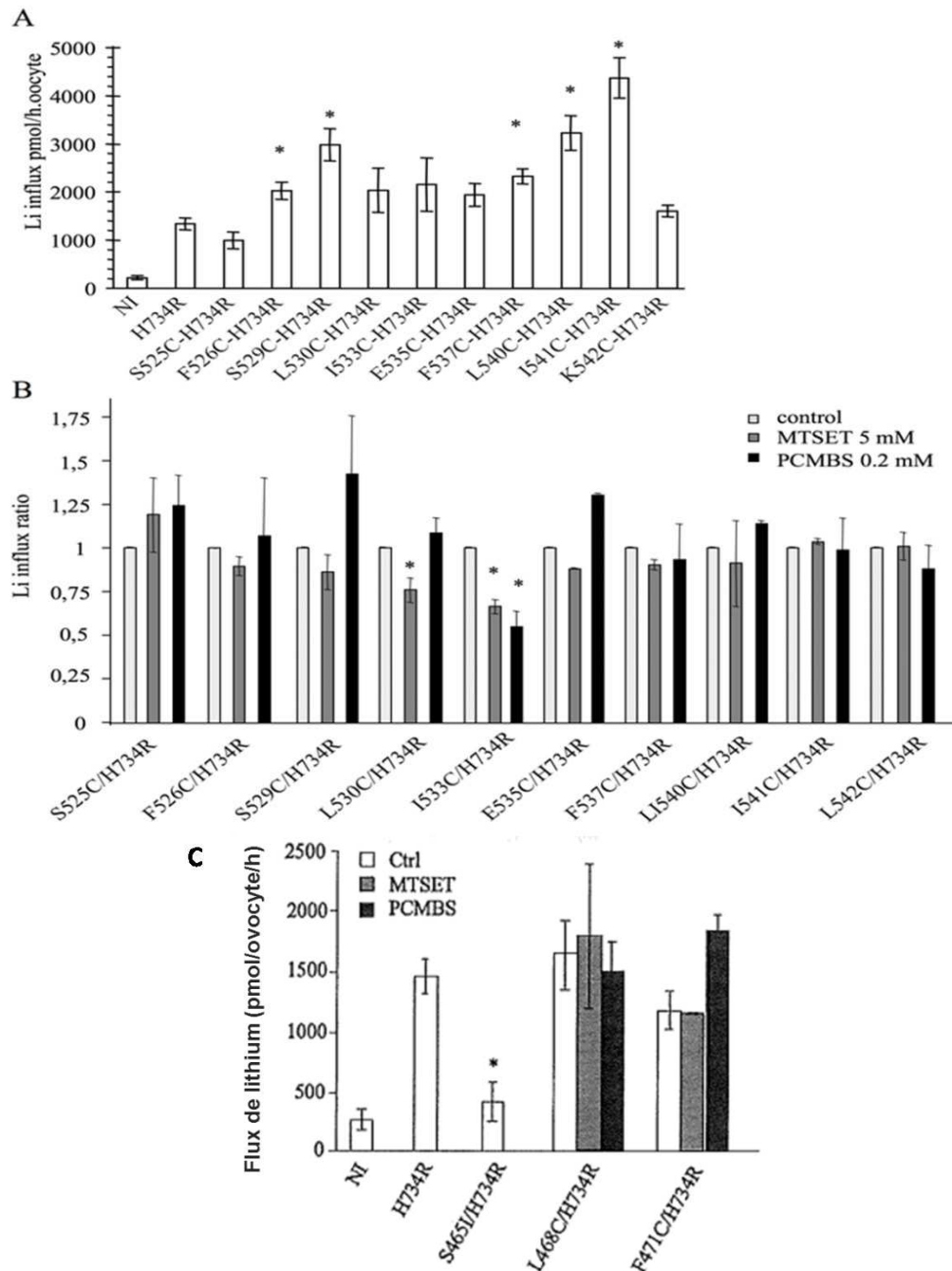


Figure 40. Mesure de l'entrée de lithium dans des ovocytes de xénopes exprimant des mutants H734R et cystéines dans TM5 et TM3.

(A) Influx de lithium dans des ovocytes non-injectés, exprimant l'AE1 H734R ou l'AE1 portant une double mutation dans le TM5.

(B) Effets des réactifs cystéines sur l'influx de lithium dans les doubles mutants du TM5 normalisé pour chaque mutant par rapport aux ovocytes sans réactif.

(C) Influx de lithium dans des ovocytes non-injectés, exprimant l'AE1 H734R ou l'AE1 portant une double mutation dans le TM3.

(* test t de student, $p \leq 0,05$)

L'entrée de lithium provoquée par l'addition de la double mutation H734R est plus importante que l'entrée lithium induite par des mutations cystéine seules dans le TM 5 (figure 40A par rapport à la figure 37B). Par ailleurs, on peut observer que cette différence ne peut pas être imputable à des variations de la quantité membranaire de protéine à la membrane plasmique des ovocytes (figure 41).

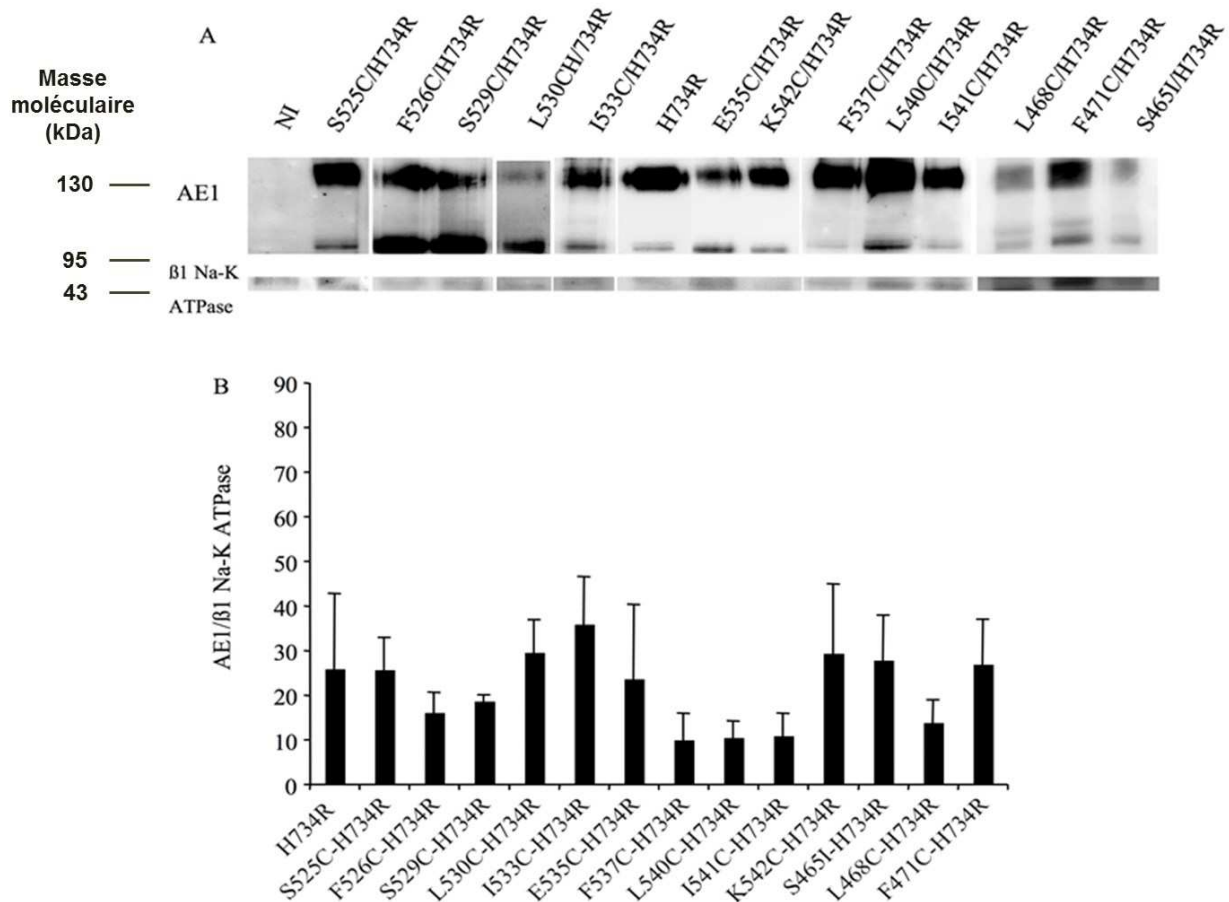


Figure 41. Expression membranaire des doubles mutants H734R et cystéines dans TM 3 et 5.

(A) Western blots de membranes d'ovocytes biotinylés exprimant les doubles mutants de l'AE1 révélés avec des anticorps dirigés contre l'AE1 (partie du haut) ou la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+/K^+ ATPase (partie du bas).

(B) Quantifications des westerns blot obtenus (moyennes de 3 expériences indépendantes).

3.6.4.5.2 Effet de la liaison de réactifs cystéine sur les doubles mutants H734R-Cys du TM5.

Les ovocytes exprimant les doubles mutants H734R-Cystéine dans le TM5 ont été traités par MTSET, MTSEA ou PCMBs avant mesure du flux de lithium. La figure 40B montre que 2 positions, C530 et C533 sont affectées par le MTSET et/ou le PCMBs. Le MTSET inhibe de 25% l'influx de lithium sur le mutant H734R-L530C, alors que le PCMBs et le MTSET inhibent de 45% et 33% respectivement l'influx de lithium dans les ovocytes exprimant H734R-I533C.

Ainsi, les positions C533 et C530 sont accessibles aux cations dans un AE1 dépourvu d'activité d'échange anionique mais uniquement perméable aux cations.

3.6.4.6 Importance de la position 465 dans l'échange d'ion de l'AE1.

Lors des expériences sur les simples mutants du TM3 nous avons constaté que la position 465 semblait importante pour le passage des ions (Figure 38B).

Nous avons effectué les mêmes mutations sur S465 dans l'AE1-H734R et mesuré l'entrée de lithium dans les ovocytes exprimant ces constructions (figure 42B).

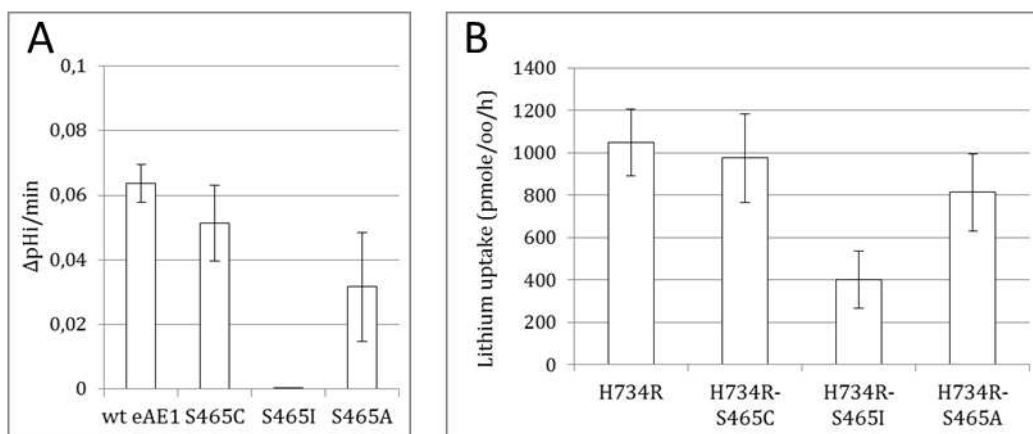


Figure 42. Perméabilité aux ions des mutants ponctuels sur la position 465 du TM3.

Cette figure met en parallèle les effets de la mutation de l'acide aminé S465I sur le passage des ions dans l'AE1 (A) Mesure de la régulation de pH dans l'ovocyte de xénope exprimant l'AE1 sauvage ou l'une des trois mutations ponctuelle de la Serine 465. (Ces résultats ont déjà été montrés dans la figure 38B)

(B) Mesure de l'entrée de lithium dans l'ovocyte de xénope exprimant l'AE1-H734R ou l'une des trois doubles mutations associant H734R et une mutation ponctuelle de la Serine 465.

Nous avons déjà noté que la simple mutation S465I bloquait complètement l'échange chlorure/bicarbonate alors que les substitutions par d'autres acides aminés plus petits (alanine ou cystéine) n'affectaient pas significativement cet échange (figure 38B ou 42A). De la même manière, des doubles mutants associant une mutation H734R à des mutations sur la position 465 ont le même profil : En effet nous ne constatons pas d'inhibition significative lors des mutations S465C ou S465A alors que la mutation S465I induit une forte réduction de l'influx de lithium mesuré (figure 42B).

Ces derniers résultats soulignent d'autant plus l'importance de l'acide aminé Sérine 465 dans le passage des ions par l'AE1. Cela suggère que cette position particulière ferait aussi partie du site de passage des ions dans l'AE1 sauvage et H734R.

L'effet de la liaison de réactifs chimiques sur la cystéine accessible a ensuite été évalué sur ces doubles mutants (figure 40B). Les ovocytes exprimant les doubles mutants H734R/Cys dans le TM5 ont été traités par MTSET, MTSEA ou PCMBs avant mesure du flux de lithium. La figure 40B montre que 2 positions, C530 et C533 pourraient être affectées par le MTSET et/ou le PCMBs. Le MTSET inhibe de 25% l'influx de lithium sur le mutant L530C/H734R, alors que le

PCMBS et le MTSET inhibent de 45% et 33% respectivement l'influx de lithium dans les ovocytes exprimant I533C/H734R.

3.6.4.6.1 Perméabilité au lithium des mutants H734R sur segment transmembranaire 3.

Nous avons observé que le pCMBS bloque l'échange d'anions de deux mutants cystéine dans le TM3 (L468C et F471C) et du mutant isoleucine et S465I. Nous avons vérifié si on pouvait aussi bloquer la fuite de cations créée par une mutation H734R sur ces trois positions.

Nous avons donc procédé comme pour le TM5 et créé les mutants H734R-L468C, H734R-F471C et H734R-S465I. Nous avons vérifié l'expression membranaire (figure 41) sans pouvoir constater de différence significative dans leur niveau d'expression membranaire par rapport à l'AE1-H734R contrôle.

Dans la figure 40C nous avons évalué l'influx de lithium de ces mutants H734R-L468C, H734R-F471C. Lors des mesures nous n'avons pas pu constater d'inhibition significative par le PCMBS 1mM, ni par le MTSET 10mM. En revanche, une forte réduction de l'influx de lithium est observée dans les ovocytes exprimant le mutant H734R-S465I suggérant l'importance de la Ser465 dans la fuite de cations induite par la mutation H734R. Ceci permet de valider l'implication du TM3 dans la fuite de cations.

Discussion

4 Discussion.

4.1 Le modèle du cotransporteur uracile-proton.

Proposer un modèle définitif pour l'AE1 est problématique car il y a peu de données structurales pour la partie membranaire de l'AE1 et l'élaboration de cristaux de l'AE1 est rendue difficile à cause de contraintes expérimentales (Lemieux *et al.*, 2002). Néanmoins en 2010, une structure d'un dimère d'AE1 a été publiée, basée sur un cristal avec une définition de 7,5 à 16 Å (Yamaguchi *et al.*, 2010a, Yamaguchi *et al.*, 2010b). Cette résolution ne permet pas la détection précise des structures tertiaires ni le placement des acides aminés. Cependant les auteurs ont proposé une projection de leur cristal sur la structure du canal CIC d'*Escherichia coli*, en réalité un échangeur proton/chlorure. Pour cela, les auteurs ont construit une carte tridimensionnelle de l'AE1 avec une définition de 7,5 Å après avoir fusionné 31 images de densité électronique obtenues à partir de leur cristal. Cette carte 3D a ensuite été projetée en deux dimensions et comparée avec une projection du canal CIC obtenue de la même manière à partir de données avec une résolution de 6,5 Å publiées par J.A. Mindell *et al.* (Mindell *et al.*, 2001). Cette comparaison a permis aux auteurs de proposer que les TM1+TM2 et les TM8+TM9 de l'AE1 formaient une structure antiparallèle autour du pore de l'AE1. Malgré tout, les auteurs ont noté que si selon leur modèle, l'AE1 et le CIC ont une similarité structurale, leurs conformations sont significativement différentes. Ils expliquent cette discordance par des différences existant entre les séquences des deux protéines ou à des changements de conformation dans la structure du CIC.

Beaucoup plus récemment P. Bonar & J.R. Casey (Bonar *et al.*, 2013) ont repris ces observations pour proposer un modèle de la partie membranaire (résidus 388 à 911) de l'AE1 construit par homologie et basé sur le même canal CIC.

Selon les auteurs, les séquences de l'AE1 humain et du CIC d'*E coli*. ont une identité de 9,8% et une similitude de 18,4%. De plus, le modèle de l'AE1 que P. Bonar propose comporte de nombreuses lacunes notamment Glu480-Ser525 et Thr728-Gly838 qui correspondent à de larges boucles extracellulaires dans le modèle du CIC. Les auteurs mettent en avant la localisation membranaire en dimère du CIC, où chaque monomère fonctionne indépendamment, ainsi que sa vitesse de fonctionnement de $2.1 \cdot 10^3$ ions/s (Accardi *et al.*, 2010) qui se rapproche de celle de l'AE1 ($5 \cdot 10^4$ ions/s. (Jennings, 1989)), malgré une différence d'un facteur 20. De plus deux autres transporteurs de bicarbonate les SLC26A3 et SLC26A6 (voir « introduction/Les autres transporteurs de bicarbonates ») ont été modélisés grâce au CIC (Ohana *et al.*, 2011).

L'identification du TM8 comme bordant le site de transport de l'AE1 par le groupe de Joe Casey, ainsi que les données de topologie publiées qui sont présentés dans la partie « introduction/modèle topologique de l'AE1 », restent valides sur leur modèle du domaine transmembranaire de l'AE1 basé sur le CIC. Cependant l'orientation de certains acides aminés, notamment ceux du TM8 est discutable (cf. partie 4.3 « liaison des réactifs sulfhydriles avec les cystéines »).

De manière surprenante, parmi les résultats que nous avons obtenus de notre côté, le CIC d'*E. coli* ne fait pas partie des meilleurs scores retenus par les logiciels d'analyses. Même en imposant le CIC ([PDB: 1OTS](#)) à I-TASSER, que nous avons utilisé pour notre propre modèle, le résultat n'a pas atteint une compatibilité suffisante avec les données de topologie paramétrées pour être retenu. Par exemple la région Arg808-Leu835 qui a été positionnée du côté intracellulaire par des études de liaison d'anticorps (Wainwright *et al.*, 1990) est placée côté extracellulaire sur le modèle basé sur le CIC.

Notre modèle basé sur l'UraA nous a permis de mettre en avant plusieurs résidus appartenant aux TM3 et TM5 : la leucine 530, l'isoleucine 533, la leucine 468 et la phénylalanine 471, susceptibles d'être impliqués dans l'activité de transport. Nous avons ensuite pu valider biochimiquement leur présence dans le site de passage des ions. Sur le modèle du CIC, ces quatre acides aminés sont très éloignés des deux résidus clés du TM 8: la leucine 669 et la leucine 673, qui ont été mis en évidence tant par l'équipe de Casey que par nos travaux comme faisant partie du site de passage des ions. L'organisation imposée par le CIC est incompatible avec les données de liaison de réactifs sulfhydriles que nous avons recueillies. Le modèle basé sur l'UraA est beaucoup moins évasé que celui du CIC et correspond mieux avec ces données. Néanmoins, l'acide glutamique 681 du TM 8 essentiel à l'échange chlorure /bicarbonate est moins accessible dans le modèle UraA que dans celui du CIC mais cette position reste compatible avec son implication dans la fonction d'échange dans les deux modèles.

4.2 Effet des mutations cystéine sur la fonction d'échange de l'AE1.

Lors des mutations cystéine du TM 8 aucun des mutants testés ne présentait de fuite cationique avec une simple mutation. Pour induire une fuite cationique nous avons muté une seconde fois l'AE1-cystéine par une substitution H734R. Certaines mutations cystéine sur des acides aminés dans les TM 3 et TM 5 faisaient diminuer voire disparaître l'échange chlorure/bicarbonate (S525C, I528C, F532C or E535C) (figure 36) et éventuellement apparaître une fuite de cations insensible à la ouabaine et au bumétanide sans avoir besoin de faire une seconde mutation (F526C, I528C, F532C, Y534C, K539C et L540C) (figure 37). Cependant ces fuites de cations

restaient plus faibles que celle induite par la seule mutation H734R (la différence mesurée est d'un facteur 3 à 5). Lorsque que nous avons effectué une seconde mutation H734R sur le simple mutant L540C nous avons constaté que le double mutant avait une fuite de cations plus importante que celle provoquée par les simples mutations H734R ou L540C même additionnées (H734R seul : 1500 pmol/ovocyte/h, L540C seul : 200 pmole/ovocyte/h et H734R-L540C : 3500pmol/ovocyte/h, figure 40). En parallèle, une simple mutation cystéine telle F526C qui ne modifiait pas significativement les propriétés de l'échangeur à elle seule, montre une fuite de cations bien supérieure lors de la double mutation avec H734R que le simple mutant H734R. Pour expliquer ces phénomènes d'amplification, nous pouvons supposer que même si elle n'est pas mesurable par nos outils chaque mutation a un impact sur l'AE1. Ces mutations à proximité du site de passage des ions semblent aller dans la même direction : un élargissement du pore ou une diminution de la sélectivité de ce dernier qui au-delà d'un certain seuil de « déformation », fait apparaître la fuite de cations et/ou disparaître la fonction d'échange d'anions.

4.3 Liaison des réactifs sulfhydriles avec les cystéines.

L'effet des réactifs sulfhydriles sur les cystéines est très variable selon la position qui a été mutée. Tous les résultats que nous avons obtenus vont dans le même sens : les meilleures inhibitions des fuites de cations ou d'échange chlorure/bicarbonate que nous avons pu observer concernent des positions situées au centre des segments transmembranaires (figure 43).

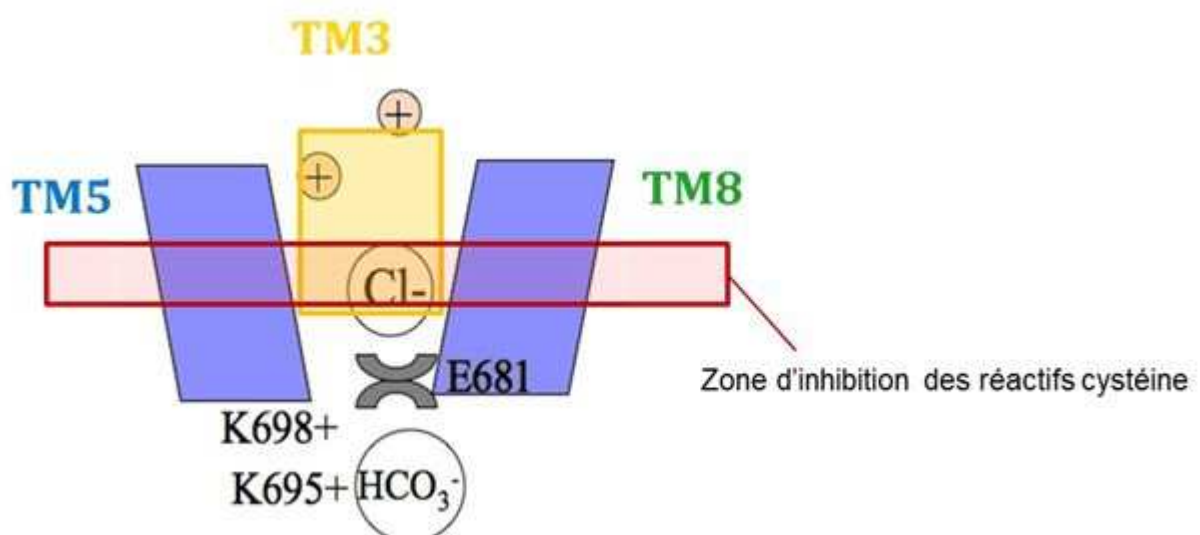


Figure 43. Zone d'inhibition par les réactifs sulfhydriles.

Dans les modèles basés sur le CIC décrit dans la littérature ou le modèle basé sur le symporteur uracile-proton que nous avons décrit, le site de passage des ions apparaît sous la forme d'un pore évasé vers l'extérieur se resserrant au niveau du glutamate 681. Dans le cadre d'une fuite de cations par ce pore, les ions vont pouvoir se faufiler sans que la protéine n'ait besoin d'effectuer de mouvement comme on le décrit pour l'échange chlorure bicarbonate (Brock *et al.*, 1983) : la protéine adopte tout à tour une conformation ouverte vers l'extérieur où elle interagit avec un premier anion, cette interaction fait basculer la protéine dans une configuration ouverte vers l'intérieur qui permet à cet anion de se retrouver à l'intérieur de la cellule où il est échangé avec le second anion qui fait rebasculer la protéine dans sa configuration d'origine.

Selon nos hypothèses, la fuite se comporte comme un canal cationique co-localisé au même endroit que le site d'échange des anions. La capacité des réactifs sulfhydryles à bloquer ou non ce passage de cations repose en partie sur un phénomène d'encombrement stérique. Dans ce système de pore évasé vers l'extérieur, le blocage optimal s'effectue donc au niveau où la taille du pore sera à peu près égale à celle des réactifs (figure 44).

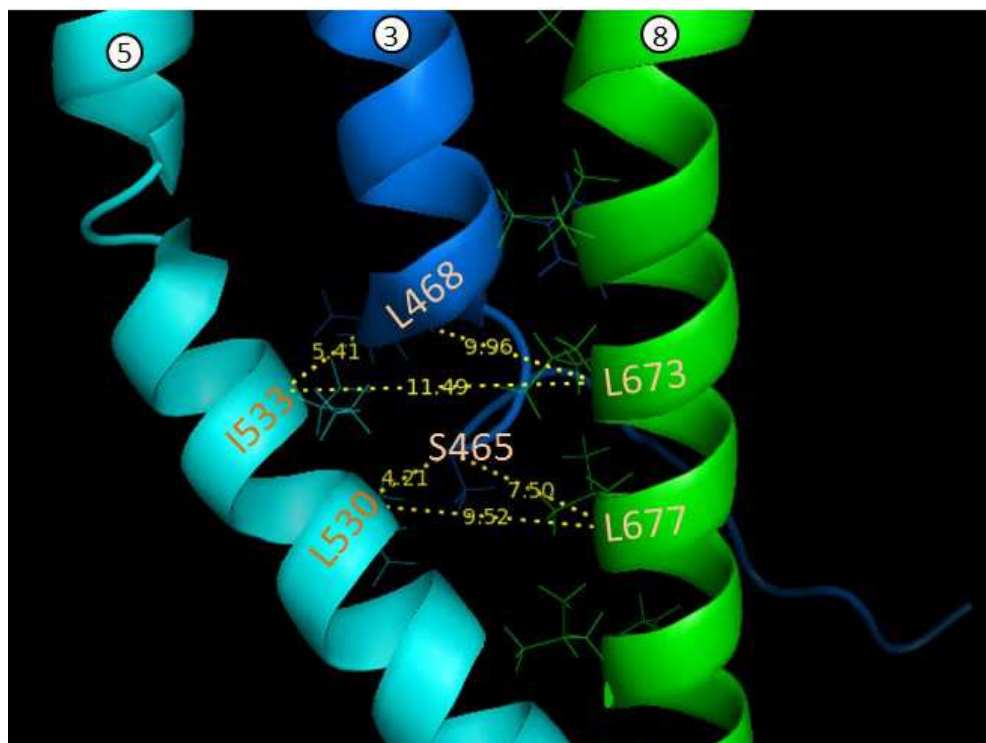


Figure 44. Pore ionique de l'AE1 dans le modèle basé sur le symporteur uracile-proton.
Sur cette figure sont affichés uniquement les segments transmembranaires 3, 5 et 8 et les mesures en Angström (en jaune) entre les différents carbones α des acides aminés annotés sur les hélices.

Selon les mesures que nous avons effectuées grâce à Pymol sur le modèle que nous avons proposé, la zone qui regroupe les lieux de mutation cystéine qui ont pu être efficacement

bloqués par les réactifs sulfhydriles dans les segments transmembranaires 3, 5 et 8 (leucine 468, phénylalanine 471, leucine 530, l'isoleucine 533, leucine 669 et la leucine 673) ou par une mutation sérine en isoleucine (sérine 465) sont du même ordre de grandeur que les réactifs PCMBs et MTSET/MTSEA (figure 44). Par exemple, le PCMBs à une configuration plane qui peut être assimilée à un rectangle de 6,5 Å de large par 9,0 Å de long lorsque on intègre le groupe thiol qui sert de liaison entre la chaîne latérale d'une cystéine et le pCMBS (Jennings, 1989).

Sur le modèle basé sur CIC les mesures sur les mêmes acides aminés donnent des valeurs 3 à 4 fois plus grandes (figure 45). De plus les TM 3, 5 et 8 sont séparées les uns des autres par d'autres segments transmembranaires. Enfin, les résidus faisant partie du pore anionique du TM8 selon l'équipe de Casey, sont orientés du côté extérieur de la protéine.

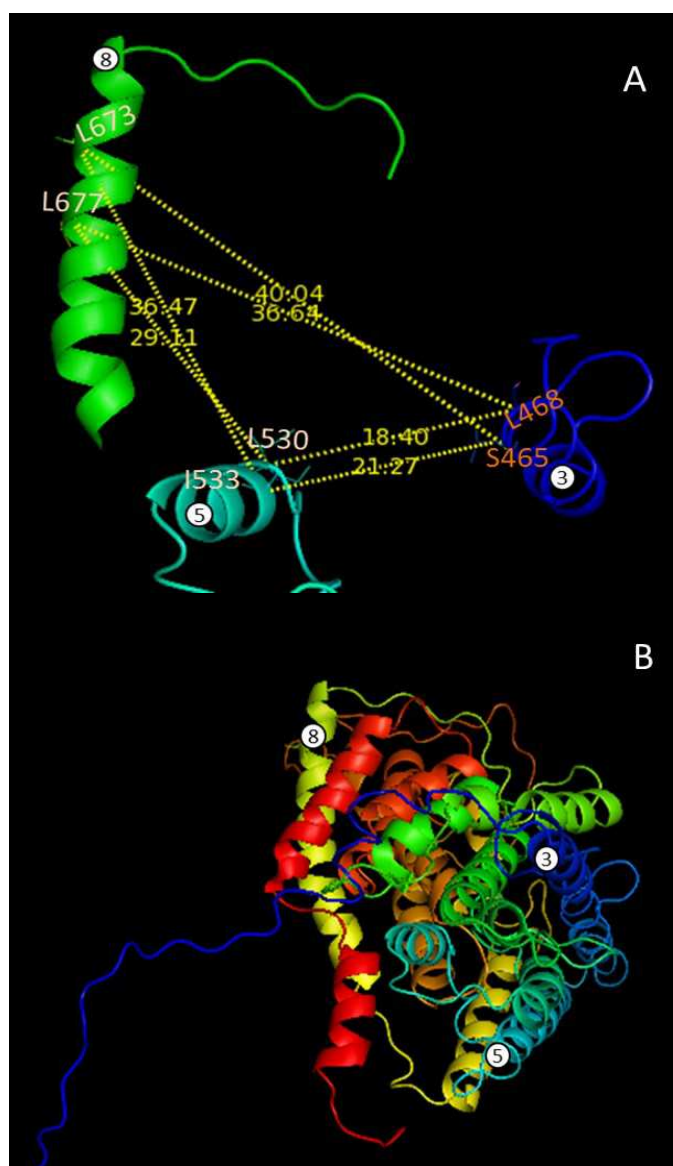


Figure 45. Pore ionique de l'AE1 dans le modèle basé sur le CIC (PDB : 1OTS).

- (A) Sur cette figure sont affichés uniquement les segments transmembranaires 3, 5 et 8 et les mesure en Ångström (en jaune) entre les différents carbones alpha des acides aminés annotés sur les hélices
(B) Partie membranaire entière.

Matériel et méthodes

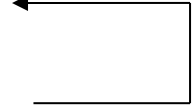
5 Matériel et méthodes.

5.1 Construction ADNc avec les mutations ponctuelles de l'hAE1.

Les mutants créés par mutation ponctuelle de l'AE1 humain (forme érythrocytaire) ont été faites à partir de la séquence de l'AE1 sauvage cloné dans le plasmide pSP65 (voir annexes pour la carte plasmide). Nous avons utilisé une stratégie de PCR en utilisant le kit « QuickChange site directed mutagenesis » (Stratagene) et des amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique) couvrant 15 bases en aval et en amont de la mutation. Le protocole de PCR utilisé est celui recommandé par le kit de mutation.

La réaction de PCR est faite à partir de 1µL de pSP65-hAE1 à 0,5µg/µL, 1µL dNTP 10mM, 1µL amorce sens 20µM, 1µL amorce anti-sens 20µM, 5µL tampon Pfu 10x, 1µL Pfu turbo, H₂O qsp 50µL.

Le cycle utilisé est le suivant:

étape de préchauffage :	95°C 3min,	
cycle PCR :	95°C, 30sec,	
	55°C 30sec,	
	68°C 12min.	
	68°C 15 min	

La PCR est suivie d'une digestion du plasmide parental par Dpn1 durant 2h à 37°C.

Dans le cas de doubles mutations nous avons utilisé deux approches différentes.

La première approche est un duo de mutations consécutives par PCR selon le protocole décrit dans le paragraphe précédant, par exemple une première mutation H734R suivi d'une seconde mutation, A666C une fois que la première mutation a bien été validée par séquençage. Cette stratégie a été utilisée pour effectuer les doubles mutants H734R-TM8 de hAE1.

La seconde approche se fait en 2 étapes :

- Chaque mutation par PCR est réalisée en parallèle sur le plasmide pSP65hAE1.
- La double mutation finale est obtenue par coupure et ligation d'un fragment d'ADN contenant une simple mutation dans un second plasmide contenant la seconde mutation. Il s'agit donc du remplacement d'une partie d'un des plasmides par un fragment d'ADN provenant du second plasmide, contenant la seconde mutation. Cette opération est effectuée grâce à l'action d'un couple d'enzymes de restriction et d'une

ligase. Sur le plasmide pSP65-hAE1 nous avons utilisé la présence de deux sites uniques de restriction PstI et HindIII situés respectivement à l'intérieur de la séquence de l'AE1 et en aval de cette dernière en suivant le sens de lecture du plasmide. Les sites de restriction PstI (coupure franche (5'-TTA|TAA-3' en position 1658 de l'hAE1) et HindIII (coupure 5'A|AGCTT-3') empêchent une insertion tête-bêche de l'insert dans le plasmide, l'insertion de plusieurs insert d'affilé ou une absence de l'insert dans un clone positif). Le fragment et le plasmide principal sont reliés grâce à la ligase T4.

Les mutations ponctuelles faites au sein du TM 8 se situent sur le même fragment PstI-HindIII que la mutation ponctuelle H734R Cette deuxième stratégie n'a donc été applicable que pour les mutations situées sur les TM 3 et TM 5 de la protéine AE1, car les deux sites de mutations (TM 3 ou TM 5 et H734R) se situent de part et d'autre du site de coupure PstI. Notons que les colonies bactériennes résultant de la transformation de bactéries compétentes avec ces constructions sont positives dans quasiment 100% des cas. Le gain de temps est significatif car les expériences peuvent débuter sans risque, en parallèle du séquençage de vérification. Dans le cas où on possède déjà des simples mutants ce gain de temps est encore plus grand.

Cette seconde approche a aussi été adaptée pour introduire la mutation G701D dans le plasmide pPB1-MDhAE1 qui a servi pour exprimer l'AE1 dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae*.

5.2 Transformation des bactéries compétentes.

Chaque plasmide construit est amplifié dans des bactéries avant d'être utilisé au laboratoire.

Des bactéries compétentes d'*Escherichia coli* (Lucigen) sont transformées avec les différents mutants de l'AE1. 10 µL de bactéries compétentes décongelés à partir d'aliquots conservés à -80°C sont placés sur glace. A t=0 est ajouté 1µL de plasmides produits par PCR dans chaque tube. Les tubes sont conservés sur glace 30 min. Un choc thermique à +42°C pendant 45 sec est réalisé, puis les tubes sont remis sur glace deux minutes après lesquelles sont ajoutés 200µL de milieu SOC. (2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM glucose). Les bactéries sont placées dans un incubateur à 37°C sous agitation lente pendant au moins une heure. Elles sont ensuite étalées sur boîte LB ampicilline et mises à pousser sur la nuit à 37°C. Le lendemain les boîtes sont placées au réfrigérateur à +4°C pour conservation.

Les bactéries ayant poussés sur les boîtes LB ampicilline sont repiquées colonie par colonie et mises en cultures dans des tubes de 10 mL « bactério » contenant 4ml de milieu LB + 4 µL ampicilline et mises à pousser une nuit à 37°C.

Les plasmides contenus dans les bactéries sont ensuite purifiés en utilisant le kit « Nucléospin Plasmid » de *Machery-Nagel* puis séquencés.

Pour chacune des mutations le plasmide d'au moins un clone positif a été séquencé aux fins de vérification (Beckman Cogenics, Takeley, Royaume-Uni), puis utilisé pour la suite des expériences.

5.3 Synthèse des ARN pour injection.

Les plasmides pSP65 contenant les AE1 mutés (milieu sans RNases) ont été linéarisés par HindIII avant la transcription. Les ARN ont été synthétisés en utilisant l'ARN polymérase SP6 (kit mMESSAGE mMACHINE Ambion) selon le protocole défini par le fabricant, sans utiliser de [α^{32} P] UTP à partir de 6 µg d'ADN linéarisé. L'incubation est de deux heures à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 1µL de TURBO DNase (fournie dans le kit) pendant 15 minutes à 37°C.

L'ARN a été précipité, par ajout de deux volumes de chlorure de lithium 8 M, pendant la nuit à -20°C. Le culot a été remis en solution dans de l'eau sans RNases est conservé à -20°C. Les concentrations des ARN ont été déterminées par absorbance UV à 260 nm et contrôlées sur gel agarose/MOPS/formaldéhyde.

5.4 Injection d'ARN dans les ovocytes de xénope.

Pour produire la protéine dans les ovocytes nous avons injecté de l'ARNc obtenus à partir des plasmides clonés dans le vecteur pSP65.

Les plasmides pSP65-hAE1 sauvage ou mutés sont linéarisés par digestion enzymatique, grâce à l'enzyme de restriction HindIII. L'ADN linéaire obtenu est ensuite transcrit en ARN grâce à la polymérase SP6 (le kit « Ambion transcription kit » a été utilisé pour la transcription)

L'ARN obtenu est injecté dans des ovocytes de xénope (*Xenopus laevis*) par micro-injection à l'aide de micropipettes fabriquées au laboratoire à partir de micro-tubes (« microcaps » 6,66 µL Drummond,) étirés grâce à un étireur SUTTER, taillés et gradués manuellement. Ces

micropipettes permettent l'injection de 50 nL de solution d'ARN par ovocyte. La quantité d'ARN injecté par ovocyte est de l'ordre de 10 ng d'ARNc d'hAE1 sauvage ou muté.

Les ovocytes injectés sont maintenus à 18°C dans du MBS (composition du MBS « Modified Barth's Saline » : NaCl 85 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, MgSO₄ 0.82 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, CaCl₂ 0,41 mM, HEPES 10 mM, NaOH 4,5 mM, pH 7,4, complété avec de la pénicilline 10 U/ml et streptomycine: 10µg/ml) pendant trois à quatre jours avant d'effectuer les expérimentations.

5.5 Modèle xénope.

La plupart des tests fonctionnels ont été effectués dans de l'ovocyte de xénope.

Les ovocytes proviennent de xénopes femelles anesthésiées avec du MS222 en suivant la procédure recommandée par notre comité d'éthique. Le MS222 ou tricaine mesylate est un relaxant musculaire. Il bloque les potentiels d'action entre le cerveau et les muscles ainsi qu'entre les muscles et le cerveau. Ainsi il n'y a plus de contraction musculaire possible ni de retour sensoriel vers le cerveau. Les ovocytes utilisés sont des ovocytes de stade V-VI.

Pour les expériences de mesure du contenu en sodium et potassium, des ovocytes sont maintenus après l'injection dans du MBS supplémenté avec du bumétanide 5 µM et de la ouabaïne 0,5 mM bloquant respectivement le cotransporteur sodium-potassium chlore (NKCC1) et la pompe sodium-potassium ATPase (Na⁺/K⁺ ATPase).

5.6 Mesure des contenus des ovocytes de xénope en sodium et potassium :

Trois à quatre jours après l'injection d'ARNc dans les ovocytes, ces derniers sont retirés de l'incubateur à 18°C, lavés deux fois rapidement dans de 2 x 7,5 ml d'eau milliQ (Millipore) glacée et placés sur des carrés de papier aluminium sans milieu de rinçage. Les ovocytes sont regroupés par lots de cinq ovocytes par carré de papier aluminium et séchés 8-10 heures dans un four à 80°C. Les ovocytes sont pesés à la sortie du four sur une balance de précision pour déterminer leur masse sèche.

Le contenu ionique est extrait des ovocytes séchés resuspendus dans 4 mL d'eau milliQ par lot de cinq ovocytes. La suspension est placée une nuit dans un réfrigérateur à 4°C. Au moment de la mesure on rajoute 2% d'acide perchlorique par tube (soit 80 µL pour 4 mL d'eau milliQ).

5.7 Mesure de l'échange chlorure/bicarbonate dans les ovocytes de xénope.

Le pH intracellulaire des ovocytes est mesuré à l'aide de microélectrodes sélectives aux protons.

La capacité des ovocytes exprimant l'AE1 sauvage ou muté de réguler le pH intracellulaire est vérifié en mesurant le pH intracellulaire dans des ovocytes acidifiés par incubation dans un milieu NaCl 63,4 mM; KCl 1 mM; HCO_3^- 24 mM; MgSO_4 0,82 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM; CaCl_2 0,41 mM; HEPES/NaOH 5 mM pH=7,35; CO_2 5%, O_2 95%. Les ovocytes sont ensuite baignés dans du MBS sans chlorure (Na^+ /Gluconate 63,4 mM; K^+ /Gluconate 1 mM; HCO_3^- 24 mM; MgSO_4 0,82 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,74 mM HEPES/NaOH 5 mM pH 7,35, CO_2 5%, O_2 95%) et l'alcalinisation potentielle résultant de ce changement de bain est déterminée.

Le dispositif de mesure est constitué d'une cuve perfusée en continu et de deux microélectrodes : une électrode KCl 3 M et une électrode avec un ionophore H^+ , destinées à être implantées dans les ovocytes (figure 46A). Les électrodes sont reliées à un électromètre enregistrant le potentiel de membrane de l'ovocyte (voie 1, électrode KCl) et le potentiel équivalent à la somme du potentiel de membrane plus le potentiel électrochimique des protons intracellulaires (électrode sensible aux H^+) valeur du pH intracellulaire (voie 2). En sortie, la différence voie 2 moins voie 1 est enregistrée, cette valeur correspond au potentiel électrochimique des ions H^+ . En début d'expérience l'électrode sensible aux H^+ est calibrée avec des solutions de pH connues ce qui permet de traduire les valeurs de potentiel de H^+ en valeur de pH intracellulaire.

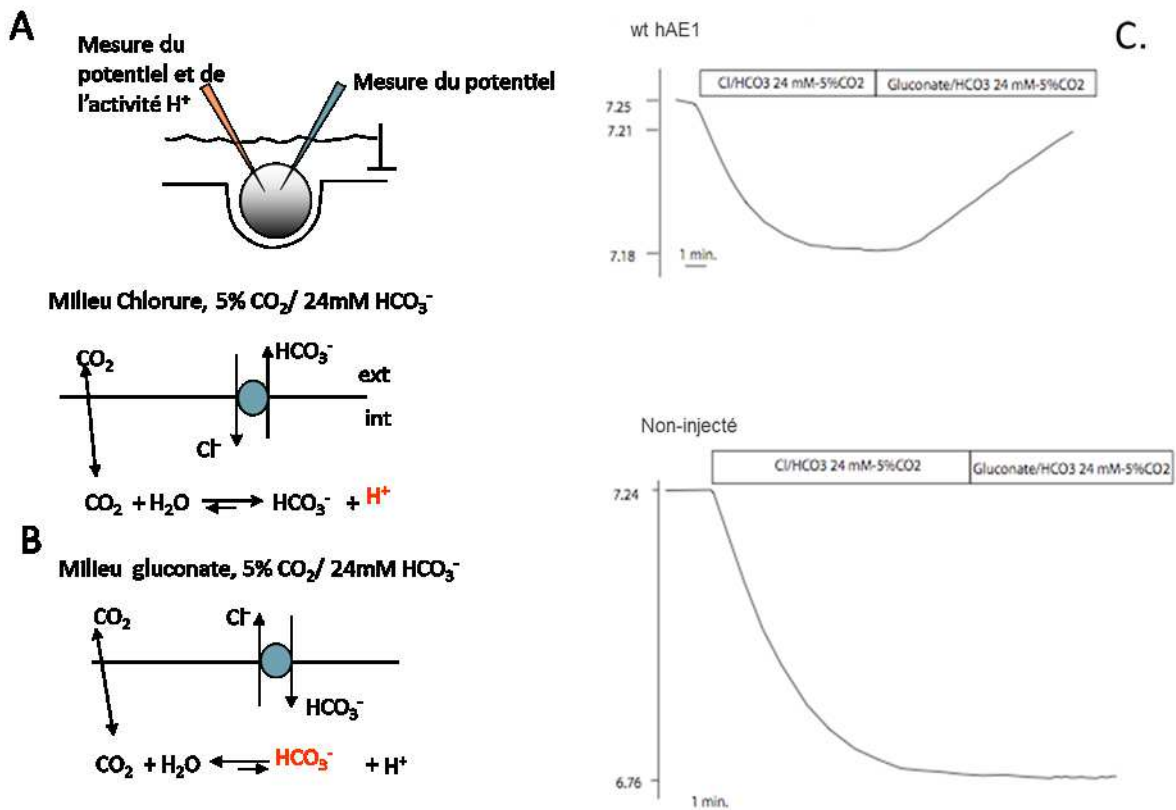


Figure 46. Mesure du pH intracellulaire des ovocytes.

(A) Schéma du montage des électrodes sur un ovocyte.

(B) Equilibre CO_2/HCO_3^- de part et d'autre de la membrane plasmique sur des ovocytes pourvus d'un échangeur AE1 fonctionnel.

(C) Enregistrement type pour des ovocytes injectés avec de l'ARN codant pour le la bande 3 sauvage (wt hAE1) ou non injecté.

Les résultats sont donnés en ΔpH_i par min, \pm s.e.m. La variation de pH intracellulaire, ΔpH_i , est mesurée lorsque les ovocytes acidifiés sont exposés au milieu sans chlorure. Cela correspond à la vitesse initiale de l'alcalinisation.

5.8 Mesure des mouvements de lithium dans l'ovocyte de xénope.

Le lithium est utilisé comme substitut du sodium et du potassium pour les mesures de flux ionique dans les ovocytes de xénope. Naturellement absent des milieux de culture et des milieux cellulaires, l'utilisation du lithium permet de s'abstenir d'utiliser des isotopes radioactifs du sodium et du potassium. Pour prévenir les mouvements de cations par d'autres protéines que l'AE1, dans les ovocytes de xénope pendant les mesures nous avons utilisé des bloqueurs de la Na^+/K^+ -ATPase et du co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$. L'incubation des ovocytes pour l'expérience est faite en présence de 5 μ M de bumétanide et 0,5mM ouabaine dans du $LiNO_3$ MBS ($LiNO_3$ 85 mM; KNO_3 1 mM; $NaHCO_3$ 2.4 mM; $MgSO_4$ 0.82 mM; $Ca(NO_3)_2$ 0.33 mM; $CaCl_2$ 0.41 mM; HEPES 10 mM; NaOH 4.5 mM; pH 7.4). Pour chaque expérience, 9 oocytes

par condition sont réunis et incubés deux heures dans la solution à 19°C. En fin d'incubation les ovocytes sont séparés individuellement dans des tubes *Eppendorf*TM de 1,5 mL après avoir été rincés dans d'eau distillée milliQ glacée. Ils sont ensuite lysés grâce à 50 µL d'une solution de soude à 0,1 N puis dilués dans un volume final de 300 µL d'eau distillée milliQ. Le lithium contenu dans les échantillons est mesuré par spectrométrie d'absorption atomique avec un Perkin Elmer AAS3110. Les résultats sont exprimés en pmol par ovocyte et par heure, et moyennés par condition \pm s.e.m (erreur standard à la moyenne).

5.9 Thioalkylations:

La thiolalkylation des cystéines est effectuée par une incubation de 15 minutes à température ambiante dans du MBS avec 0,2 à 1 mM de pCMBS (para-chloro-mercuri-benzene sulfonate), 5 mM MTSEA (2-aminoethyl méthane thiosulfonate hydrobromide) préparé à partir d'une solution stock à 1 M dans du DMSO conservée à -20°C. Le MTSET (2(triméthylammonium)ethyl méthane thiosulfonate bromide), est pesé, préparé et solubilisé dans du MBS à 5 mM juste avant son utilisation. Après 15 minutes, les ovocytes sont lavés dans du MBS et directement placés dans la solution de lithium ou de MBS pour la mesure de pH.

5.10 Biotinylation et préparation des protéines membranaires.

Pour détecter l'AE1 adressé à la membrane plasmique des ovocytes, les lysines des protéines de surface sont marquées avec de la sulfo-NHS-SS-Biotine (Pierce). Le marquage se fait pendant 15 minutes dans du MBS à pH 8 à 4°C. La réaction est arrêtée avec un tampon 125 mM glycine, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄. Les ovocytes sont ensuite lavés dans du MBS pH8 et lysés mécaniquement dans un tampon d'homogénéisation (20 mM Tris HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM inhibiteur de protéase *Péfabloc*TM (Roche)).

Les membranes des ovocytes sont récupérées grâce à trois centrifugations successives du surnageant à 2000, 4000 et 6000g. Le surnageant final est solubilisé dans un tampon RIPA (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 8, 1% Nonidet P40, 0.5 % Deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM *Péfabloc*TM, 30 min. 4°C). Les protéines marquées à la biotine sont isolées grâce à une fixation sur des billes en résine d'avidine (Pierce) 30min à 4°C. Après un nouveau lavage en tampon RIPA les protéines marquées sont séparées des billes directement par le tampon d'élution utilisé pour le SDS-PAGE.

5.11 SDS-PAGE et transfert sur membrane des échantillons.

Les échantillons de protéines sélectionnées par biotinylation à partir de préparation de membranes plasmique d'ovocytes sont analysés par SDS-PAGE.

30µL d'échantillon sont chargés dans chaque puits correspondant à 50µg de protéines.

Le gel de séparation de l'électrophorèse est un gel de 8% acrylamide dans lequel les échantillons migrent pendant 0,8h (= 48 min) à 1h à voltage constant (200V) et 500mA.

Les protéines contenues dans le gel d'électrophorèse sont transférés sur une membrane de PVDF (Immobilon-P Membrane de Millipore) grâce à un transfert semi-sec effectué à 5W pendant 45 minutes.

5.12 Immunodétection dans les échantillons d'ovocytes.

L'immunodétection des protéines a été effectuée à partir d'échantillons de protéines sélectionnées par biotinylation à partir de préparation de membranes plasmique d'ovocytes, analysées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF (Millipore).

Les membranes de PVDF sont incubées avec les anticorps primaires spécifiques indiqués dans la légende des figures. Les anticorps secondaires sont des anticorps anti-souris ou anti-lapin couplés à une peroxydase (Sigma) et détectés par chimiluminescence avec le réactif « Immobilon Western reagent » (Millipore) et Fusion FX7 (Vilber-Lourmat, France). Pour comparer les niveaux d'expression de l'AE1 dans des échantillons différents nous avons utilisé un marqueur des membranes cellulaire : la sous-unité $\beta 1$ Na-K-ATPase (Sigma).

Les anti-corps utilisés sont de l'Anti CDB3 (produit chez le lapin, don du Dr Phillip Low, Purdue University, Indiana, USA) qui marque un épitope intracellulaire de l'AE1 et l'anti- Na-K-ATPase (sous-unité $\beta 1$) de Sigma.

5.13 Expression de l'AE1 dans la levure.

Pour effectuer les expériences de production d'AE1 dans la levure nous avons utilisé trois plasmides différents. Nous avons ensuite transfecté les plasmides dans la levure selon le protocole décrit par O. Joubert (Joubert *et al.*, 2010).

5.13.1 Plasmide pYEPGal.

Le vecteur pYEPGal contient le promoteur inductible pGAL1-10. Ce promoteur est activé en présence de galactose et réprimé en présence de glucose. La répression par le glucose est dominante par rapport à l'activation due au galactose et la souche K699 ne consomme que du galactose en absence de glucose dans le milieu. La séquence pour la purification des protéines (MAP : *Multitag Affinity Purification*), un site de reconnaissance pour la calmoduline (CBD : *Calmodulin Binding Domain*), un tag streptavidine et un tag hexahistidine pour chromatographie d'affinité, et un peptide hémagglutinine (HA) pour analyse par Western-blot anti-HA sont insérés entre les sites de restriction *Bam*HI et *Xho*I.

Les 5 mutants de l'AE1 induisant une perméabilité cationique et associés aux stomatocytoses héréditaires (L687P, D705Y, S731P, H734R et R760Q) ont été clonés dans le vecteur d'expression pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*, pYEPGal, inductible par le galactose.

La souche de levure K699 avait été transfectée avec ces différentes constructions : pYEPGal-AE1-L687P, pYEPGal-AE1-D705Y, pYEPGal-AE1-S731P, pYEPGal-AE1-H734R, pYEPGal-AE1-R760Q, Elles ont été sélectionnées en contrôlant par western blot l'expression inductible par le galactose des mutants de l'AE1. Ces constructions et le test d'expression avait été effectué entre janvier et juillet 2007 avant mon arrivée dans le laboratoire (données non-publiées).

5.13.2 Plasmide pDDGFP-2

Nous avons cloné le mutant S731P et l'AE1 sauvage dans un plasmide pDDGFP-2 (Newstead *et al.*, 2007). Ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline Amp^r et le gène de sélection URA3 qui permet aux souches de levure de pousser dans un milieu sans Uracile. Ce plasmide permet d'exprimer la protéine d'intérêt fusionnée avec la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Cette fusion permet de faciliter la sélection des clones positifs, exprimant la protéine à haut niveau, dans la levure. La protéine GFP facilite le processus de sélection car elle devient

fluorescente seulement si la protéine en amont parvient à intégrer la membrane correctement (Drew *et al.*, 2001).

Pour effectuer le clonage dans *Saccharomyces cerevisiae* nous avons utilisé le plasmide que nous a gracieusement fourni David Drew, et dans lequel nous avons placés l'AE1 par recombinaison comme décrit dans son protocole (Drew *et al.*, 2008).

Le principe de ce clonage est de transformer des bactéries *Escherichia coli* DH5 α avec le plasmide vide, linéarisé par SmaI et le gène d'intérêt flanqué par les séquences de recombinaisons complémentaires de celles incluses dans le plasmide.

Cette opération s'effectue en trois étapes :

- Insertion de la séquence de recombinaison autour de la séquence de l'AE1 par PCR. Elle a été effectuée grâce des amorces longues contenant dans une première partie la séquence complémentaire de la séquence de recombinaison et dans une seconde partie une séquence complémentaire de la séquence de l'AE1. La séquence de l'AE1 a été digérée au préalable par HindIII pour être compatible avec les amorces. Les amorces ont été commandées chez Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgique).
- Mélange du produit de PCR avec le plasmide pDDGFP-2 linéarisé par SmaI.
- Transformation de *Escherichia coli* DH5 α et encemencement dans un milieu contenant de l'ampicilline. Les plasmides de plusieurs colonies résistantes à l'ampicilline ont été récupérés et séquencés pour vérifier l'insertion correcte la séquence de l'AE1 dans pDDGFP-2.

Les plasmides pDDGFP-AE1 et pDDGFP-AE1-S731P ont servi à transformer la souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* déjà utilisées par David Drew (Drew *et al.*, 2008). La sélection des levures a été effectuée dans un milieu sans uracile. La production de protéines recombinantes a ensuite été vérifiée visuellement grâce à la florescence GFP puis par western blot sur les colonies positives à la GFP.

5.13.3 Plasmide pB1-MDhAE1.

Nous avons aussi utilisé le plasmide pB1-MDhAE1 pour exprimer dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* K699, l'AE1 sauvage et l'AE1-G701D. Ce plasmide a déjà été utilisé par l'équipe de J. Casey pour exprimer l'AE1 sauvage à un haut niveau d'expression dans la levure (Sekler *et al.*, 1995a). Ce plasmide pB1-MDhAE1 nous a été généreusement fourni par J. Casey. La construction fournie par Casey contient un fragment BamHI de l'ADNc de l'AE1 codant pour la région 183-911 de l'AE1 humain suivi d'un tag HIS (tag de purification par affinité codant pour 6

histidines). Cette construction est soumise au promoteur constitutif de la phosphoglycerate kinase.

La création du G701D dans le plasmide pB1-MDhAE1 a été faite par coupure-ligation comme décrit dans la partie « Construction ADNc avec les mutations ponctuelles de l'hAE1 ».

L'efficacité de la production de l'AE1 a été mesurée par western blot à partir d'échantillons issus de préparations de membrane de levure exprimant l'AE1 sauvage ou l'AE1 G701D.

5.14 Milieux de culture des levures.

Les levures *S. cerevisiae* K699 (Mata, ura3, and leu 2-3) sont cultivées dans un milieu riche YEP (1% extrait de levures, 2% Bacto-peptone) complété par 10% D-glucose, 10% D-fructose ou 10% D-galactose.

Le milieu sélectif utilisé est un milieu Leucine⁻ (Difco yeast nitrogen base 8 g/L sans acides aminés supplémenté avec un mélange d'acides aminés sans leucine: adénine 5,5 mg/L, tyrosine 5,5 mg/L, uracile 5,5 mg/L, arginine 2mg/L, l'histidine 1mg/L, lysine 4mg/L, méthionine 1 mg/L, phénylalanine 6 mg/L, thréonine 5mg/L, tryptophane 4 mg/L).

La souche de levure utilisée pour le plasmide pDDGFP-AE1 ainsi que les milieux de culture sont décrits en détail dans le protocole de David Drew (Drew *et al.*, 2008).

5.15 Culture des levures.

S. cerevisiae sont transformées avec l'un des vecteurs décrits ci-dessus et cultivés à 30 ou 20°C à 220 rpm dans un milieu YEP supplémentés avec 2% glucose ou 2% fructose, dilués à D.O._{600nm} = 0,2. Les milieux de cultures sont ensuite supplémentés par 2% de galactose pour les levures avec le vecteur pYEPGal, jusqu'à atteindre une D.O._{600nm} = 5, puis centrifugés pendant 10 minutes à 450g et 4°C avant la préparation des extraits.

5.16 Extraits de levure et préparation des membranes.

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les levures sont lavées dans de l'eau distillée et re-suspendues dans un tampon de lyse (50mM phosphate de sodium (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5%

glycérol, et 1 mM PMSF), puis cassées par vortex trois fois 7 minutes à 4°C avec des billes en verre (425–600 µm, Sigma). Les levures non cassées sont culotées pendant 10 min à 450g, les extraits sont obtenus à partir du surnageant. Les membranes sont préparées en centrifugeant les extraits à 50000g pendant 1h30. Lors de la préparation des extraits de membranes plasmiques trois centrifugations à 2000, 4000 et 6000g sont réalisées au préalable pour éliminer les noyaux et le plus gros des membranes intracellulaires avant l'ultracentrifugation à 50000g.

5.17 Gel d'électrophorèse et Western blotting pour les levures.

Les échantillons de levure sont séparés grâce à un SDS–PAGE 10% et transférés sur nitrocellulose en utilisant les protocoles conseillés par les fabricants. 50 à 80 µg de membranes *S. cerevisiae* sont solubilisés dans un tampon A (50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 100mM NaCl, 20% glycerol, 1mM PMSF) plus 1.0% de détergent et 0.2% cholesteryl hemisuccinate (CHS, Sigma) 1 heure à 4°C sous agitation modérée.

Les immunoblots sont marqués avec un anticorps anti-HA (produit chez la souris, Santa Cruz Biotechnology) pour les constructions dans pYEPGal ou un anti corps anti-CDB3 pour les constructions dans les deux autres plasmides. Ils sont couplés à des anticorps secondaires spécifiques anti-souris ou anti-lapin couplés à un système-HRP, puis révélés grâce à un kit ECL (Amersham Biosciences).

5.18 Recoupement des données expérimentales et bio statistiques.

Le regroupement, le traitement des données et les tests statistiques ont été faits grâce à deux logiciels : Excel (office.microsoft.com) et R (www.r-project.org/) selon les modalités décrites pour chaque expérience.

Références bibliographiques

6 Références bibliographiques.

- Abe, Y., Hamasaki, T., Turusaki, S., Takazaki, S., Jin, X., Kang, D. and Hamasaki, N. (2006). A simple search of TM segments in polytopic membrane protein using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Pept Lett* **13**, 761-767.
- Accardi, A. and Picollo, A. (2010). CLC channels and transporters: proteins with borderline personalities. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1457-1464.
- Alper, S.L., Chernova, M.N., Williams, J., Zasloff, M., Law, F.Y. and Knauf, P.A. (1998). Differential inhibition of AE1 and AE2 anion exchangers by oxonol dyes and by novel polyaminosterol analogs of the shark antibiotic squalamine. *Biochem Cell Biol* **76**, 799-806.
- Alvarez, B.V., Vilas, G.L. and Casey, J.R. (2005). Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *EMBO J* **24**, 2499-2511.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. (2000). The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol* **10**, R53-55.
- Barneaud-Rocca, D., Borgese, F. and Guizouarn, H. (2011a). Dual transport properties of anion exchanger 1: the same transmembrane segment is involved in anion exchange and in a cation leak. *J Biol Chem* **286**, 8909-8916.
- Barneaud-Rocca, D., Etchebest, C. and Guizouarn, H. (2013). Structural Model of the Anion Exchanger 1 (SLC4A1) and Identification of Transmembrane Segments Forming the Transport Site. *J Biol Chem* **288**, 26372-26384.
- Barneaud-Rocca, D., Pellissier, B., Borgese, F. and Guizouarn, H. (2011b). Band 3 missense mutations and stomatocytosis: insight into the molecular mechanism responsible for monovalent cation leak. *Int J Cell Biol* **2011**, 136802.
- Bonar, P., Schneider, H.P., Becker, H.M., Deitmer, J.W. and Casey, J.R. (2013). Three-dimensional model for the human Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, AE1, by homology to the E. coli CIC protein. *J Mol Biol* **425**, 2591-2608.
- Boron, W.F. and Boulpaep, E.L. (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J Gen Physiol* **81**, 53-94.
- Brock, C.J., Tanner, M.J. and Kempf, C. (1983). The human erythrocyte anion-transport protein. Partial amino acid sequence, conformation and a possible molecular mechanism for anion exchange. *Biochem J* **213**, 577-586.
- Brosius, F.C., Pisoni, R.L., Cao, X., Deshmukh, G., Yannoukakos, D., Stuart-Tilley, A.K., *et al.* (1997). AE anion exchanger mRNA and protein expression in vascular smooth muscle cells, aorta, and renal microvessels. *Am J Physiol* **273**, F1039-1047.
- Bruce, L.J., Anstee, D.J., Spring, F.A. and Tanner, M.J. (1994). Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854-->Leu. *J Biol Chem* **269**, 16155-16158.
- Bruce, L.J., Beckmann, R., Ribeiro, M.L., Peters, L.L., Chasis, J.A., Delaunay, J., *et al.* (2003). A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* **101**, 4180-4188.
- Bruce, L.J., Cope, D.L., Jones, G.K., Schofield, A.E., Burley, M., Povey, S., *et al.* (1997). Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J Clin Invest* **100**, 1693-1707.
- Bruce, L.J., Kay, M.M., Lawrence, C. and Tanner, M.J. (1993). Band 3 HT, a human red-cell variant associated with acanthocytosis and increased anion transport, carries the mutation Pro-868-->Leu in the membrane domain of band 3. *Biochem J* **293** (Pt 2), 317-320.
- Bruce, L.J., Robinson, H.C., Guizouarn, H., Borgese, F., Harrison, P., King, M.J., *et al.* (2005). Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in

- the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat Genet* **37**, 1258-1263.
- Bruce, L.J., Wrong, O., Toye, A.M., Young, M.T., Ogle, G., Ismail, Z., *et al.* (2000). Band 3 mutations, renal tubular acidosis and South-East Asian ovalocytosis in Malaysia and Papua New Guinea: loss of up to 95% band 3 transport in red cells. *Biochem J* **350 Pt 1**, 41-51.
- Burnham, C.E., Amlal, H., Wang, Z., Shull, G.E. and Soleimani, M. (1997). Cloning and functional expression of a human kidney Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* **272**, 19111-19114.
- Chernova, M.N., Jiang, L., Shmukler, B.E., Schweinfest, C.W., Blanco, P., Freedman, S.D., *et al.* (2003). Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **549**, 3-19.
- Chu, H. and Low, P.S. (2006). Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem J* **400**, 143-151.
- Cingolani, H.E., Chiappe, G.E., Ennis, I.L., Morgan, P.G., Alvarez, B.V., Casey, J.R., *et al.* (2003). Influence of Na⁺-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange on the slow force response to myocardial stretch. *Circ Res* **93**, 1082-1088.
- Cobb, C.E. and Beth, A.H. (1990). Identification of the eosinyl-5-maleimide reaction site on the human erythrocyte anion-exchange protein: overlap with the reaction sites of other chemical probes. *Biochemistry* **29**, 8283-8290.
- Delaunay, J., Alloisio, N., Morlé, L. and Carré, G. (1995) La sphérocytose héréditaire en 1995 : l'apport de la génétique moléculaire. In *Hématologie*, J.L. Eurotext (ed.). pp. 115-122.
- Devonald, M.A., Smith, A.N., Poon, J.P., Ihrke, G. and Karet, F.E. (2003). Non-polarized targeting of AE1 causes autosomal dominant distal renal tubular acidosis. *Nat Genet* **33**, 125-127.
- Drew, D., Newstead, S., Sonoda, Y., Kim, H., von Heijne, G. and Iwata, S. (2008). GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc* **3**, 784-798.
- Drew, D.E., von Heijne, G., Nordlund, P. and de Gier, J.W. (2001). Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **507**, 220-224.
- Ellory, J.C., Guizouarn, H., Borgese, F., Bruce, L.J., Wilkins, R.J. and Stewart, G.W. (2009). Review. Leaky Cl⁻-HCO₃⁻ exchangers: cation fluxes via modified AE1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 189-194.
- Erickson, H.K. and Kyte, J. (1998). Lysine-691 of the anion exchanger from human erythrocytes is located on its cytoplasmic surface. *Biochem J* **336 (Pt 2)**, 443-449.
- Ferreira, G.C. and Pedersen, P.L. (1992). Overexpression of higher eukaryotic membrane proteins in bacteria. Novel insights obtained with the liver mitochondrial proton/phosphate symporter. *J Biol Chem* **267**, 5460-5466.
- Fujinaga, J., Tang, X.B. and Casey, J.R. (1999). Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1. *J Biol Chem* **274**, 6626-6633.
- Gawenis, L.R., Bradford, E.M., Alper, S.L., Prasad, V. and Shull, G.E. (2010). AE2 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger is required for normal cAMP-stimulated anion secretion in murine proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G493-503.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **38**, W695-699.
- Greeley, T., Shumaker, H., Wang, Z., Schweinfest, C.W. and Soleimani, M. (2001). Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G1301-1308.
- Guizouarn, H., Borgese, F., Gabillat, N., Harrison, P., Goede, J.S., McMahon, C., *et al.* (2011). South-east Asian ovalocytosis and the cryohydrocytosis form of hereditary stomatocytosis show virtually indistinguishable cation permeability defects. *Br J Haematol* **152**, 655-664.
- Guizouarn, H., Martial, S., Gabillat, N. and Borgese, F. (2007). Point mutations involved in red cell stomatocytosis convert the electroneutral anion exchanger 1 to a nonselective cation conductance. *Blood* **110**, 2158-2165.

- Gunn, R.B. and Fröhlich, O. (1979). Asymmetry in the mechanism for anion exchange in human red blood cell membranes. Evidence for reciprocating sites that react with one transported anion at a time. *J Gen Physiol* **74**, 351-374.
- Hadley, T., Saul, A., Lamont, G., Hudson, D.E., Miller, L.H. and Kidson, C. (1983). Resistance of Melanesian elliptocytes (ovalocytes) to invasion by *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vitro. *J Clin Invest* **71**, 780-782.
- Hargreaves, W.R., Giedd, K.N., Verkleij, A. and Branton, D. (1980). Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte membranes and in lipid vesicles. *J Biol Chem* **255**, 11965-11972.
- Hentschke, M., Wiemann, M., Hentschke, S., Kurth, I., Hermans-Borgmeyer, I., Seidenbecher, T., *et al.* (2006). Mice with a targeted disruption of the Cl-/HCO₃⁻ exchanger AE3 display a reduced seizure threshold. *Mol Cell Biol* **26**, 182-191.
- Hirai, T., Hamasaki, N., Yamaguchi, T. and Ikeda, Y. (2011). Topology models of anion exchanger 1 that incorporate the anti-parallel V-shaped motifs found in the EM structure. *Biochem Cell Biol* **89**, 148-156.
- Janas, T. (2000). Reversible DIDS binding to band 3 protein in human erythrocyte membranes. *Mol Membr Biol* **17**, 109-115.
- Janas, T. (2011). Involvement of carboxyl groups in chloride transport and reversible DIDS binding to band 3 protein in human erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett* **16**, 342-358.
- Janas, T., Bjerrum, P.J., Brahm, J. and Wieth, J.O. (1989). Kinetics of reversible DIDS inhibition of chloride self exchange in human erythrocytes. *Am J Physiol* **257**, C601-606.
- Jarolim, P., Kalábová, D. and Reid, M.E. (2004). Substitution Glu480Lys in erythroid band 3 corresponds to the Fr(a) blood group antigen and supports existence of the second ectoplasmic loop of band 3. *Transfusion* **44**, 684-689.
- Jarolim, P., Palek, J., Amato, D., Hassan, K., Sapak, P., Nurse, G.T., *et al.* (1991). Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11022-11026.
- Jarolim, P., Rubin, H.L., Liu, S.C., Cho, M.R., Brabec, V., Derick, L.H., *et al.* (1994). Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 (AE1) gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (band 3PRAGUE). *J Clin Invest* **93**, 121-130.
- Jarolim, P., Shayakul, C., Prabakaran, D., Jiang, L., Stuart-Tilley, A., Rubin, H.L., *et al.* (1998). Autosomal dominant distal renal tubular acidosis is associated in three families with heterozygosity for the R589H mutation in the AE1 (band 3) Cl-/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* **273**, 6380-6388.
- Jennings, M.L. (1989). Characteristics of the binding site for extracellular substrate anions in human red blood cell band 3. *Ann N Y Acad Sci* **574**, 84-95.
- Jennings, M.L. (2013). TRANSPORT OF HYDROGEN SULFIDE AND HYDROSULFIDE ANION ACROSS THE HUMAN RED BLOOD CELL MEMBRANE Rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl-/HS⁻ exchange. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Jennings, M.L. and Al-Rhaiyel, S. (1988). Modification of a carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter. *J Gen Physiol* **92**, 161-178.
- Jennings, M.L. and Anderson, M.P. (1987). Chemical modification and labeling of glutamate residues at the stilbenedisulfonate site of human red blood cell band 3 protein. *J Biol Chem* **262**, 1691-1697.
- Jennings, M.L. and Smith, J.S. (1992). Anion-proton cotransport through the human red blood cell band 3 protein. Role of glutamate 681. *J Biol Chem* **267**, 13964-13971.
- Jin, X.R., Abe, Y., Li, C.Y. and Hamasaki, N. (2003). Histidine-834 of human erythrocyte band 3 has an essential role in the conformational changes that occur during the band 3-mediated anion exchange. *Biochemistry* **42**, 12927-12932.
- Joubert, O., Nehmé, R., Bidet, M. and Mus-Veteau, I. (2010). Heterologous expression of human membrane receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **601**, 87-103.
- Kang, D., Okubo, K., Hamasaki, N., Kuroda, N. and Shiraki, H. (1992). A structural study of the membrane domain of band 3 by tryptic digestion. Conformational change of band 3 in situ induced by alkali treatment. *J Biol Chem* **267**, 19211-19217.

- Kanki, T., Young, M.T., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Tanner, M.J. (2003). The N-terminal region of the transmembrane domain of human erythrocyte band 3. Residues critical for membrane insertion and transport activity. *J Biol Chem* **278**, 5564-5573.
- Karet, F.E., Gainza, F.J., Györy, A.Z., Unwin, R.J., Wrong, O., Tanner, M.J., *et al.* (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6337-6342.
- Kay, M.M., Bosman, G.J. and Lawrence, C. (1988). Functional topography of band 3: specific structural alteration linked to functional aberrations in human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 492-496.
- Kidson, C., Lamont, G., Saul, A. and Nurse, G.T. (1981). Ovalocytic erythrocytes from Melanesians are resistant to invasion by malaria parasites in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5829-5832.
- Kittanakom, S., Cordat, E., Akkarapatumwong, V., Yenchitsomanus, P.T. and Reithmeier, R.A. (2004). Trafficking defects of a novel autosomal recessive distal renal tubular acidosis mutant (S773P) of the human kidney anion exchanger (kAE1). *J Biol Chem* **279**, 40960-40971.
- Knauf, F., Yang, C.L., Thomson, R.B., Mentone, S.A., Giebisch, G. and Aronson, P.S. (2001). Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9425-9430.
- Knauf, P.A., Gasbjerg, P.K. and Brahm, J. (1996). The asymmetry of chloride transport at 38 degrees C in human red blood cell membranes. *J Gen Physiol* **108**, 577-589.
- Knauf, P.A., Law, F.Y. and Hahn, K. (1995). An oxonol dye is the most potent known inhibitor of band 3-mediated anion exchange. *Am J Physiol* **269**, C1073-1077.
- Ko, S.B., Luo, X., Hager, H., Rojek, A., Choi, J.Y., Licht, C., *et al.* (2002). AE4 is a DIDS-sensitive Cl(-)/HCO(-)(3) exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1206-1218.
- Ko, S.B., Zeng, W., Dorwart, M.R., Luo, X., Kim, K.H., Millen, L., *et al.* (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* **6**, 343-350.
- Kobayashi, S., Morgans, C.W., Casey, J.R. and Kopito, R.R. (1994). AE3 anion exchanger isoforms in the vertebrate retina: developmental regulation and differential expression in neurons and glia. *J Neurosci* **14**, 6266-6279.
- Kopito, R.R., Lee, B.S., Simmons, D.M., Lindsey, A.E., Morgans, C.W. and Schneider, K. (1989). Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* **59**, 927-937.
- Kopito, R.R. and Lodish, H.F. (1985). Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* **316**, 234-238.
- Kudrycki, K.E., Newman, P.R. and Shull, G.E. (1990). cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl-/HCO3- exchanger. *J Biol Chem* **265**, 462-471.
- Kujala, M., Tienari, J., Lohi, H., Elomaa, O., Sariola, H., Lehtonen, E. and Kere, J. (2005). SLC26A6 and SLC26A7 anion exchangers have a distinct distribution in human kidney. *Nephron Exp Nephrol* **101**, e50-58.
- Kuma, H., Shinde, A.A., Howren, T.R. and Jennings, M.L. (2002). Topology of the anion exchange protein AE1: the controversial sidedness of lysine 743. *Biochemistry* **41**, 3380-3388.
- Lemieux, M.J., Reithmeier, R.A. and Wang, D.N. (2002). Importance of detergent and phospholipid in the crystallization of the human erythrocyte anion-exchanger membrane domain. *J Struct Biol* **137**, 322-332.
- Lewis, B.A. and Engelman, D.M. (1983). Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J Mol Biol* **166**, 211-217.
- Li, C., Takazaki, S., Jin, X., Kang, D., Abe, Y. and Hamasaki, N. (2006). Identification of oxidized methionine sites in erythrocyte membrane protein by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry peptide mapping. *Biochemistry* **45**, 12117-12124.
- Linn, S.C., Kudrycki, K.E. and Shull, G.E. (1992). The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N terminus distinct from that of the brain AE3 Cl-/HCO3-

- exchanger. Cloning of a cardiac AE3 cDNA, organization of the AE3 gene, and identification of an alternative transcription initiation site. *J Biol Chem* **267**, 7927-7935.
- Lipovich, L., Lynch, E.D., Lee, M.K. and King, M.C. (2001). A novel sodium bicarbonate cotransporter-like gene in an ancient duplicated region: SLC4A9 at 5q31. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0011.
- Liu, S.C., Zhai, S., Palek, J., Golan, D.E., Amato, D., Hassan, K., *et al.* (1990). Molecular defect of the band 3 protein in southeast Asian ovalocytosis. *N Engl J Med* **323**, 1530-1538.
- Lohi, H., Kujala, M., Makela, S., Lehtonen, E., Kestila, M., Saarialho-Kere, U., *et al.* (2002). Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *J Biol Chem* **277**, 14246-14254.
- Lohi, H., Lamprecht, G., Markovich, D., Heil, A., Kujala, M., Seidler, U. and Kere, J. (2003). Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C769-779.
- Long, S.B., Campbell, E.B. and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903.
- Lovering, A.L., Ride, J.P., Bunce, C.M., Desmond, J.C., Cummings, S.M. and White, S.A. (2004). Crystal structures of prostaglandin D(2) 11-ketoreductase (AKR1C3) in complex with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs flufenamic acid and indomethacin. *Cancer Res* **64**, 1802-1810.
- Low, P.S. (1986). Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. *Biochim Biophys Acta* **864**, 145-167.
- Mahajan, R.J., Baldwin, M.L., Harig, J.M., Ramaswamy, K. and Dudeja, P.K. (1996). Chloride transport in human proximal colonic apical membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1280**, 12-18.
- Maren, T.H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* **47**, 595-781.
- Markovich, D. (2001). Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiol Rev* **81**, 1499-1533.
- Medina, J.F., Acín, A. and Prieto, J. (1997). Molecular cloning and characterization of the human AE2 anion exchanger (SLC4A2) gene. *Genomics* **39**, 74-85.
- Melvin, J.E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P.J. and Shull, G.E. (1999). Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **274**, 22855-22861.
- Mindell, J.A., Maduke, M., Miller, C. and Grigorieff, N. (2001). Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* **409**, 219-223.
- Mori, A., Okubo, K., Kang, D. and Hamasaki, N. (1995). A structural study of the carboxyl terminal region of the human erythrocyte band 3 protein. *J Biochem* **118**, 1192-1198.
- Morrison, A.C., Srinivas, S.K., Elovitz, M.A. and Puschett, J.B. (2010). Genetic variation in solute carrier genes is associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* **203**, 491.e491-491.e413.
- Moseley, R.H., Höglund, P., Wu, G.D., Silberg, D.G., Haila, S., de la Chapelle, A., *et al.* (1999). Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol* **276**, G185-192.
- Muallem, S., Blissard, D., Cragoe, E.J. and Sachs, G. (1988). Activation of the Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by stimulation of acid secretion in the parietal cell. *J Biol Chem* **263**, 14703-14711.
- Newstead, S., Kim, H., von Heijne, G., Iwata, S. and Drew, D. (2007). High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13936-13941.
- Ohana, E., Shcheynikov, N., Yang, D., So, I. and Muallem, S. (2011). Determinants of coupled transport and uncoupled current by the electrogenic SLC26 transporters. *J Gen Physiol* **137**, 239-251.
- Okubo, K., Kang, D., Hamasaki, N. and Jennings, M.L. (1994). Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H₂DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule. *J Biol Chem* **269**, 1918-1926.

- Pang, A.J., Bustos, S.P. and Reithmeier, R.A. (2008). Structural characterization of the cytosolic domain of kidney chloride/bicarbonate anion exchanger 1 (kAE1). *Biochemistry* **47**, 4510-4517.
- Parker, M.D., Ourmozdi, E.P. and Tanner, M.J. (2001). Human BTR1, a new bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 1103-1109.
- Passow, H. (1986). Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **103**, 61-203.
- Passow, H., Fasold, H., Gärtner, E.M., Legrum, B., Ruffing, W. and Zaki, L. (1980). Anion transport across the red blood cell membrane and the conformation of the protein in Band 3. *Ann N Y Acad Sci* **341**, 361-383.
- Perrotta, S., Borriello, A., Scaloni, A., De Franceschi, L., Brunati, A.M., Turrini, F., *et al.* (2005). The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: implications for band 3 function. *Blood* **106**, 4359-4366.
- Perrotta, S., Gallagher, P.G. and Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet* **372**, 1411-1426.
- Petrovic, S., Ju, X., Barone, S., Seidler, U., Alper, S.L., Lohi, H., *et al.* (2003). Identification of a basolateral Cl-/HCO₃⁻ exchanger specific to gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G1093-1103.
- Poole, J. (2000). Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Rev* **14**, 31-43.
- Popov, M., Tam, L.Y., Li, J. and Reithmeier, R.A. (1997). Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. *J Biol Chem* **272**, 18325-18332.
- Pushkin, A., Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J. and Kurtz, I. (1999). Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* **274**, 16569-16575.
- Pushkin, A., Abuladze, N., Newman, D., Lee, I., Xu, G. and Kurtz, I. (2000). Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 215-218.
- Romero, M.F., Fulton, C.M. and Boron, W.F. (2004). The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflügers Arch* **447**, 495-509.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738.
- Royaux, I.E., Suzuki, K., Mori, A., Katoh, R., Everett, L.A., Kohn, L.D. and Green, E.D. (2000). Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **141**, 839-845.
- Royaux, I.E., Wall, S.M., Karniski, L.P., Everett, L.A., Suzuki, K., Knepper, M.A. and Green, E.D. (2001). Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4221-4226.
- Rungroj, N., Devonald, M.A., Cuthbert, A.W., Reimann, F., Akkarapatumwong, V., Yenchitsomanus, P.T., *et al.* (2004). A novel missense mutation in AE1 causing autosomal dominant distal renal tubular acidosis retains normal transport function but is mistargeted in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 13833-13838.
- Russell, J.M. and Boron, W.F. (1976). Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* **264**, 73-74.
- Schofield, A.E., Reardon, D.M. and Tanner, M.J. (1992). Defective anion transport activity of the abnormal band 3 in hereditary ovalocytic red blood cells. *Nature* **355**, 836-838.
- Schwiening, C.J. and Boron, W.F. (1994). Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na(+)-dependent Cl(-)-HCO₃⁻ exchange. *J Physiol* **475**, 59-67.
- Sciortino, C.M. and Romero, M.F. (1999). Cation and voltage dependence of rat kidney electrogenic Na(+)-HCO₃⁻(3) cotransporter, rNBC, expressed in oocytes. *Am J Physiol* **277**, F611-623.

- Scott, D.A. and Karniski, L.P. (2000). Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C207-211.
- Scott, D.A., Wang, R., Kreman, T.M., Sheffield, V.C. and Karniski, L.P. (1999). The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* **21**, 440-443.
- Sekler, I., Kopito, R. and Casey, J.R. (1995a). High level expression, partial purification, and functional reconstitution of the human AE1 anion exchanger in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 21028-21034.
- Sekler, I., Lo, R.S. and Kopito, R.R. (1995b). A conserved glutamate is responsible for ion selectivity and pH dependence of the mammalian anion exchangers AE1 and AE2. *J Biol Chem* **270**, 28751-28758.
- Sharma, A.K., Rigby, A.C. and Alper, S.L. (2011). STAS domain structure and function. *Cell Physiol Biochem* **28**, 407-422.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539.
- Sowah, D. and Casey, J.R. (2011). An intramolecular transport metabolon: fusion of carbonic anhydrase II to the COOH terminus of the Cl(-)/HCO(3)(-)exchanger, AE1. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, C336-346.
- Sritippayawan, S., Kirdpon, S., Vasuvattakul, S., Wasanawatana, S., SUSAENG, W., Waiyawuth, W., *et al.* (2003). A de novo R589C mutation of anion exchanger 1 causing distal renal tubular acidosis. *Pediatr Nephrol* **18**, 644-648.
- Sterling, D., Brown, N.J., Supuran, C.T. and Casey, J.R. (2002). The functional and physical relationship between the DRA bicarbonate transporter and carbonic anhydrase II. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1522-1529.
- Sterling, D. and Casey, J.R. (1999). Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *Biochem J* **344 Pt 1**, 221-229.
- Sterling, D., Reithmeier, R.A. and Casey, J.R. (2001). A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J Biol Chem* **276**, 47886-47894.
- Stewart, A.K., Chernova, M.N., Shmukler, B.E., Wilhelm, S. and Alper, S.L. (2002). Regulation of AE2-mediated Cl- transport by intracellular or by extracellular pH requires highly conserved amino acid residues of the AE2 NH2-terminal cytoplasmic domain. *J Gen Physiol* **120**, 707-722.
- Stewart, A.K., Kurschat, C.E., Vaughan-Jones, R.D. and Alper, S.L. (2009). Putative re-entrant loop 1 of AE2 transmembrane domain has a major role in acute regulation of anion exchange by pH. *J Biol Chem* **284**, 6126-6139.
- Stewart, G.W. (2004). Hemolytic disease due to membrane ion channel disorders. *Curr Opin Hematol* **11**, 244-250.
- Tang, X.B., Fujinaga, J., Kopito, R. and Casey, J.R. (1998). Topology of the region surrounding Glu681 of human AE1 protein, the erythrocyte anion exchanger. *J Biol Chem* **273**, 22545-22553.
- Tang, X.B., Kovacs, M., Sterling, D. and Casey, J.R. (1999). Identification of residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein. *J Biol Chem* **274**, 3557-3564.
- Tanner, M.J., Martin, P.G. and High, S. (1988). The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem J* **256**, 703-712.
- Tanphaichitr, V.S., Sumbonnanonda, A., Ideguchi, H., Shayakul, C., Brugnara, C., Takao, M., *et al.* (1998). Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycophorin A. *J Clin Invest* **102**, 2173-2179.
- Tarran, R., Grubb, B.R., Gatzky, J.T., Davis, C.W. and Boucher, R.C. (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol* **118**, 223-236.
- Ton, V.K. and Rao, R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C580-589.

- Toye, A.M., Banting, G. and Tanner, M.J. (2004). Regions of human kidney anion exchanger 1 (kAE1) required for basolateral targeting of kAE1 in polarised kidney cells: mis-targeting explains dominant renal tubular acidosis (dRTA). *J Cell Sci* **117**, 1399-1410.
- Tsuganezawa, H., Kobayashi, K., Iyori, M., Araki, T., Koizumi, A., Watanabe, S., *et al.* (2001). A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J Biol Chem* **276**, 8180-8189.
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., *et al.* (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**, 688-694.
- van Adelsberg, J.S., Edwards, J.C. and al-Awqati, Q. (1993). The apical Cl/HCO₃ exchanger of beta intercalated cells. *J Biol Chem* **268**, 11283-11289.
- Vilas, G.L., Johnson, D.E., Freund, P. and Casey, J.R. (2009). Characterization of an epilepsy-associated variant of the human Cl/HCO₃⁻ exchanger AE3. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C526-536.
- Vince, J.W., Carlsson, U. and Reithmeier, R.A. (2000a). Localization of the Cl/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **39**, 13344-13349.
- Vince, J.W. and Reithmeier, R.A. (2000b). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl(-)/HCO₃⁻ anion exchanger AE1. *Biochemistry* **39**, 5527-5533.
- Vincourt, J.B., Jullien, D., Kossida, S., Amalric, F. and Girard, J.P. (2002). Molecular cloning of SLC26A7, a novel member of the SLC26 sulfate/anion transporter family, from high endothelial venules and kidney. *Genomics* **79**, 249-256.
- Vithana, E.N., Morgan, P., Sundaresan, P., Ebenezer, N.D., Tan, D.T., Mohamed, M.D., *et al.* (2006). Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet* **38**, 755-757.
- Wainwright, S.D., Mawby, W.J. and Tanner, M.J. (1990). The membrane domain of the human erythrocyte anion transport protein. Epitope mapping of a monoclonal antibody defines the location of a cytoplasmic loop near the C-terminus of the protein. *Biochem J* **272**, 265-268.
- Walder, J.A., Chatterjee, R., Steck, T.L., Low, P.S., Musso, G.F., Kaiser, E.T., *et al.* (1984). The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* **259**, 10238-10246.
- Walsh, S., Borgese, F., Gabillat, N., Unwin, R. and Guizouarn, H. (2008). Cation transport activity of anion exchanger 1 mutations found in inherited distal renal tubular acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F343-350.
- Wang, C.Z., Yano, H., Nagashima, K. and Seino, S. (2000). The Na⁺-driven Cl/HCO₃⁻ exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization. *J Biol Chem* **275**, 35486-35490.
- Wang, Z., Schultheis, P.J. and Shull, G.E. (1996). Three N-terminal variants of the AE2 Cl/HCO₃⁻ exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem* **271**, 7835-7843.
- Wheat, V.J., Shumaker, H., Burnham, C., Shull, G.E., Yankaskas, J.R. and Soleimani, M. (2000). CFTR induces the expression of DRA along with Cl(-)/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C62-71.
- Whittamore, J.M., Freel, R.W. and Hatch, M. (2013). Sulfate secretion and chloride absorption are mediated by the anion exchanger DRA (Slc26a3) in the mouse cecum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G172-184.
- Wu, J., Glimcher, L.H. and Aliprantis, A.O. (2008). HCO₃⁻/Cl⁻ anion exchanger SLC4A2 is required for proper osteoclast differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16934-16939.
- Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., *et al.* (2010a). Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol* **169**, 406-412.
- Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N. and Hirai, T. (2010b). Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol* **397**, 179-189.

- Yannoukakos, D., Stuart-Tilley, A., Fernandez, H.A., Fey, P., Duyk, G. and Alper, S.L. (1994). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. *Circ Res* **75**, 603-614.
- Yano, H., Wang, C., Yamashita, S., Yokoyama, Y., Yokoi, N. and Seino, S. (2000). Assignment of the human solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member 10 gene (SLC4A10) to 2q23-->q24 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 276-277.
- Young, M.T. and Tanner, M.J. (2003). Distinct regions of human glycophorin A enhance human red cell anion exchanger (band 3; AE1) transport function and surface trafficking. *J Biol Chem* **278**, 32954-32961.
- Zhang, D., Kiyatkin, A., Bolin, J.T. and Low, P.S. (2000). Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood* **96**, 2925-2933.
- Zhu, Q. and Casey, J.R. (2004). The substrate anion selectivity filter in the human erythrocyte Cl-/HCO₃⁻ exchange protein, AE1. *J Biol Chem* **279**, 23565-23573.
- Zhu, Q., Lee, D.W. and Casey, J.R. (2003). Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. *J Biol Chem* **278**, 3112-3120.

Annexes

7 Annexes.

7.1 Alignement des séquences de l'AE3, l'AE2 et l'AE1.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Séquence pH sensible: WRETARWIKFEE.

```
>sp|P02730|B3AT_HUMAN Band 3 anion transport protein 1 OS=Homo sapiens GN=SLC4A1
PE=1 SV=3
>sp|P04920|B3A2_HUMAN Anion exchange protein 2 OS=Homo sapiens GN=SLC4A2 PE=1 SV=4
>sp|P48751|B3A3_HUMAN Anion exchange protein 3 OS=Homo sapiens GN=SLC4A3 PE=2 SV=2
```

Séquence pH sensible

```
AE3 sp|P48751|B3A3_HUMAN MANGVIPPPGGASPLPQVRVPLEEPPLSPDVEEEDDDLGLTAVSRFGDLISKPPAWDPE 60
AE2 sp|P04920|B3A2_HUMAN MSSAPRRPAKGA DSFCTPEPESLGP GTPGFPEQE EDELHRTLGVVERFEEILQEAGSRGGE 60
AE1 sp|P02730|B3AT_HUMAN -----MEELQDD-----YEDMMEEN----- 15
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN KPSRSYSERDFEFHRHTSHHTHHPLSARLPPPHKLRLRPPTSARHTRKRKKEKTSAPPS 120
sp|P04920|B3A2_HUMAN EPGRSYGEEDFEYHRQSSHHIHHPLSTHLPPDARRRKTPQGPGRKPRRR-----PGASPT 115
sp|P02730|B3AT_HUMAN -----LEQEYE-----DPDIP----- 27
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN EGTPIQEEGGAGVDEEEEEEEEEEGESEAEPEPVEPPHSGTPQKAKFSIGSD-----ED 173
sp|P04920|B3A2_HUMAN GETPTIEEG-----EEDEDEASEAEAGARALTQPSVPSTPSSVQFFLQEDDSADRKAER 168
sp|P02730|B3AT_HUMAN -----ESQMEEPAAHDETEATATDYHTTSHPG----- 53
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN DSPGLPGRAAVTKPLPSVGPHTDKSPQHSSSSPSPRARASRLA-----GEKSRPWSPSA- 227
sp|P04920|B3A2_HUMAN TSPSSPAPLPHQEATPRASKGAQAGTQVEEAEAEAVAVASGTAGGDDGGASGRPLPKAQP 228
sp|P02730|B3AT_HUMAN -----
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN ---SYDLRRLCPGSALGNPGGPEQQVPTDEAEQMLGSADLDDMKSHRLEDNPGVRRHL 284
sp|P04920|B3A2_HUMAN GHRSYNLQERRRIGSMTGAEQALLPRVPTDEIEAQT LATADLDLMKSHRFEDVPGVRRHL 288
sp|P02730|B3AT_HUMAN -----
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN -----WRE 3
sp|P04920|B3A2_HUMAN VKKPSR--TQGGG-RGSPGLAPILRKKKKKKLDRRPHEVFVELNELMLD-RSQEPHWRE 340
sp|P02730|B3AT_HUMAN VRKNAKGSTQSGREGREP GTP-----RARPRAPHKPHEVFVELNELLLD-KNQEPQWRE 342
-----THKVYVELQELVMDEKNQELRWME 77
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN TARWIKFEE----- 12
sp|P04920|B3A2_HUMAN TARWIKFEEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLELRRTIAHGAAALLDLEQTTLPGLAHV 400
sp|P02730|B3AT_HUMAN TARWIKFEEDVEEETERWGKPHVASLSFRSLELRRTLAHGAVLLDLDQQTLPGLVAHQV 402
AARWVQLEENLGEN-GAWGRPHLSHLTFWSLLELRVFTKGTVLLDLQETSLAGVANQLL 136
```

Séquence pH sensible

```
sp|P48751|B3A3_HUMAN ETMIVSDQIRPEDRASVLRLLLLKHSHPNDDKDSGFFPRNPSSSSMNSVLGNHHFT-PSH 459
sp|P04920|B3A2_HUMAN EQMVISDQIKAEDRANVLRALLLKHSHPSDEKDFS-FPRNISAGSLGSLLGHHHGQGAES 461
sp|P02730|B3AT_HUMAN DRFIFEDQIRPDREELLRALLLKHSHAGELEALG-----GVKPAVLT-----RSG 182
```

Séquence pH sensible

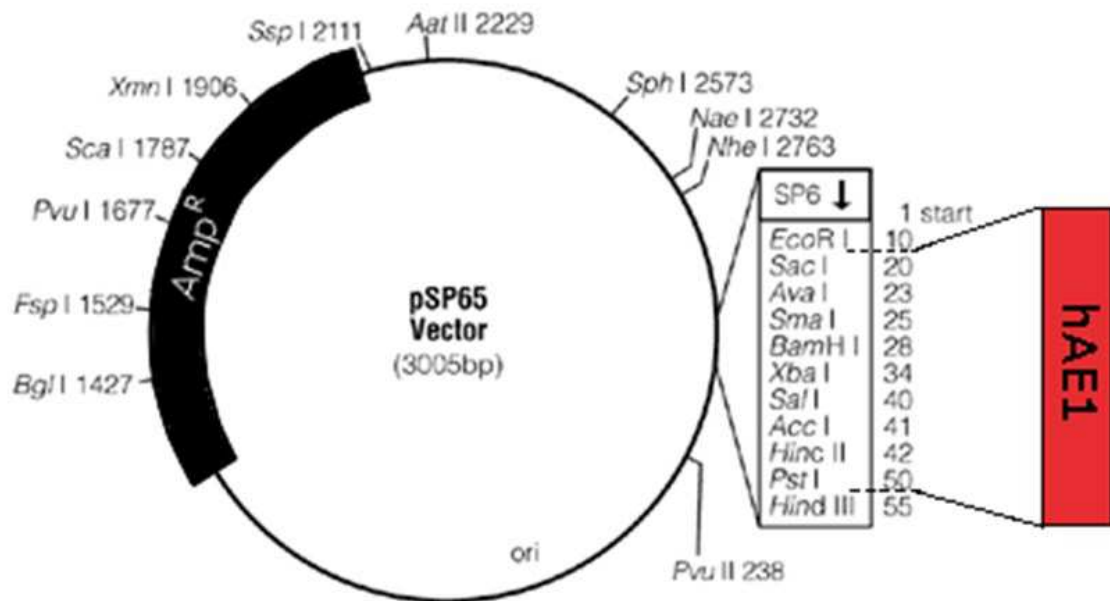
```
sp|P48751|B3A3_HUMAN GPDGAVPTMADDLGEPAPLWPHDPDAKEKPLHMPGGDGHGKS---LKLLEKIPEDAEAT 516
sp|P04920|B3A2_HUMAN DPHVTEPLMG---GVPETREVERE-RELPPAPPAGITRSKSKHELKLEKIPENAEAT 517
sp|P02730|B3AT_HUMAN DP-----SQPLLQHQSSLETQLFCEQGDGGGTEGHS--PSGILEKIPPDSEAT 227
```

Séquence pH sensible

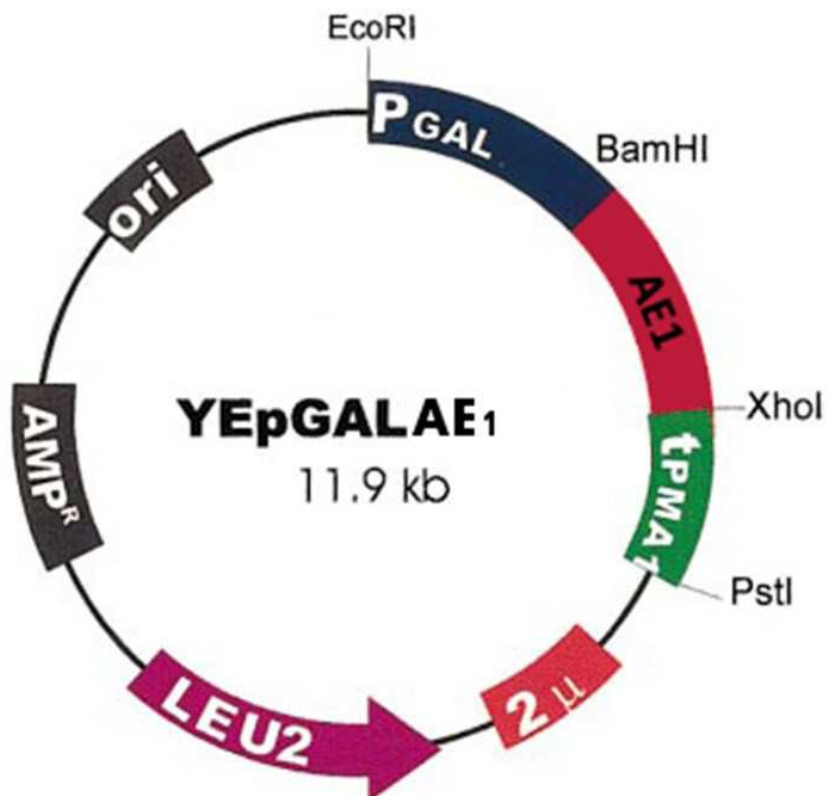
```
sp|P48751|B3A3_HUMAN VVLVGCVPFLEQPAFAAFVRLNEAVLLESVLEVPVVRFLFVMLGPSHTSTDYHELGRSIA 576
sp|P04920|B3A2_HUMAN VVLVGCVEFLSRPTMAFVRLREAVELDAVLEVPVVRFLFLLLGPSANMDYHEIGRSIS 577
sp|P02730|B3AT_HUMAN LVLVGRADFLEQPVLG FVRLQEAAELEAV-ELPVPIRFLFVLLGPEAPHIDYDTQLGAAA 286
```

Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	TLMSDKLFHEAAYQADDRQDLLSAISEFLDGSIVIPPSEVEGRDLLRSVAAFQRELLRKR	636
sp P04920 B3A2_HUMAN	TLMSDKQFHEAAYLADEREDLLTAINAFDCSVVLPPEVQGEELLRSVAHFQRMKKR	637
sp P02730 B3AT_HUMAN	TLMSEVFRIDAYMAQSRGELLHSLGFLDCSLVLPPTDAPSEQALLSLVPVQRELLRRR	346
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	REREQTKVEMTTRGGYTAPGKELSLELGGSEATPEDDPLLRRTGSVFGGLVRDVRRRYPHY	696
sp P04920 B3A2_HUMAN	EEQGRLLPTGAGLEPKSAQDKAL-LQMVEAAGAAEDDPLRRTGRPFGLLRDVRRRYPHY	696
sp P02730 B3AT_HUMAN	YQSSPAKPDSSFYKG-----LDLNGGP----DDPLQQTGQLFGGLVRDIRRRYPYY	393
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	PSDLRDALHSQCVAAVLFYFAALSPAITFGGLLGEKTEGLMGVSELIVSTAVLGVLFSL	756
sp P04920 B3A2_HUMAN	LSDFRDALDPQCLAIVIFYFAALSPAITFGGLLGEKTQDLIGVSELIMSTALQGVVFL	756
sp P02730 B3AT_HUMAN	LSDITDAFSPQVLAIVIFYFAALSPAITFGGLLGEKTRNQMGVSELLISTAVQGILFAL	453
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	LGAQPLLVLVGFSGPLLVFEEAFFKFCRAQDLEYLTGRVWVGLWLVVFLALVAAEGSFLV	816
sp P04920 B3A2_HUMAN	LGAQPLLVLVGFSGPLLVFEEAFFSCSSNHLEYLVGRVWIGFWLVLALLMVALEGSFLV	816
sp P02730 B3AT_HUMAN	LGAQPLLVLVGFSGPLLVFEEAFFSCETNGLEYIVGRVWIGFWLILVLVVLVAFEGSFLV	513
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	RYISPTQEIFAFLISLIFYETFYKLYKVFTHEPLLPFPPEGA-LEG-----SLDA	868
sp P04920 B3A2_HUMAN	RFVSRFTQEIFAFLISLIFYETFYKLVKIFQEHPLHGCSASNSSEVDGGENMTWAGARP	876
sp P02730 B3AT_HUMAN	RFISRYTQEIFSFLISLIFYETFSKLKIFQDHPLQKTY-----	553
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	GLEPNGSALPPTGPPSPRNQPNNTALLSLILMLGTFFIAFFLRKFRNSRFLGGKARRIIG	928
sp P04920 B3A2_HUMAN	TLGPGNRSLAGSQGQKPRGPNNTALLSLVLMAGTFFIAFFLRKFKNSRFFPGRIIRVIG	936
sp P02730 B3AT_HUMAN	--NYNVLMVPKQGP-----LPNTALLSLVLMAGTFFFAMMLRKFKNSSYFPGKLRRVIG	606
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	DFGIPISILVMVLVDYSITDITYTQKLTVPVGLSVTSPDKRSWFIPPLGSARFPFPMVMVA	988
sp P04920 B3A2_HUMAN	DFGVPIAILMVLVDYSIEDITYTQKLSVPSGFSVTAPEKRGWVINPLGEKSPFPVMMVA	996
sp P02730 B3AT_HUMAN	DFGVPIISILMVLVDFFIQDITYTQKLSVDPGFKVSNSSARGWVIHPLGLRSEFPIWMMA	666
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	AAVPALLVLILIFMETQITALIVSQKARRLLKSGGFHLDLLLIGSLGGLCGLFGLPWLTA	1048
sp P04920 B3A2_HUMAN	SLLPAILVFIILIFMETQITTLIIISKERMLQKSGGFHLDLLLIVAMGGICALFGLPWLAA	1056
sp P02730 B3AT_HUMAN	SALPALLVFIILIFLESQITTLIVSKPERKMKVKGSGGFHLDLLLIVMGGAALFGMPWLSA	726
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	ATVRSVTHVNALTVMRTAIPGDKPQIQEVREQRVTGVLIASLVGLSIVMGAVLRRIPLA	1108
sp P04920 B3A2_HUMAN	ATVRSVTHANALTVMKAVAPGDKPKIQEVKEQRVTGLLVALLVGLSIVIGDLLRQIPLA	1116
sp P02730 B3AT_HUMAN	TTVRSVTHANALTVMGKASTPGAAAQIQEVKEQRISGLLVAVLVGLSILMEPILSRIPLA	786
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	VLFGIFLYMGVTSLSGIQLSQRLLLIILMPAKHHPEQPYVTKVKTWRMHLFTCIQLGCIAL	1168
sp P04920 B3A2_HUMAN	VLFGIFLYMGVTSLSNGIQFYERLHLLMPPKHHDPVTVYKKVTRLRMHLFTALQLLCLAL	1176
sp P02730 B3AT_HUMAN	VLFGIFLYMGVTSLSGIQLFDRILLFLKPPKYHPDPVYVYKRVKTWRMHLFTGIQIICLAV	846
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	LWVVKSTAASLAFPFLLLLTVPLRHCLLPRLFQDRELQALDSEDAEPNFDE-DGQDEYNE	1227
sp P04920 B3A2_HUMAN	LWAVMSTAASLAFPFILITVPLRMVVLTRIFTDREMCKLDANAEFVDFDEREGVDEYNE	1236
sp P02730 B3AT_HUMAN	LWVVKSTPASLALPFVILITVPLRRVLLPLIFRNVELQCLDADDAKATFDEEGRDEYDE	906
Séquence pH sensible	-----	
sp P48751 B3A3_HUMAN	LHMPV	1232
sp P04920 B3A2_HUMAN	MPMPV	1241
sp P02730 B3AT_HUMAN	VAMPV	911

7.2 Carte du plasmide pSP65-wteAE1.



7.3 Carte du plasmide pYEPGal.



AE1 Cation Leak

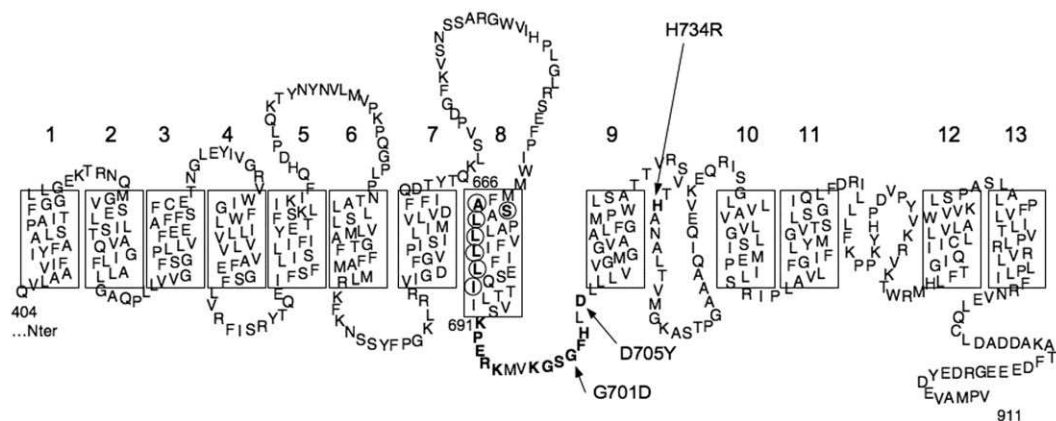


FIGURE 1. Putative topology of AE1-spanning domain according to Zhu et al. (26). The point mutations made in TM8 and in the intracellular loop between TM8 and TM9 are highlighted by bold characters. Arrows point out amino acid substitutions responsible for human pathologies and used in this study.

niques were used on a cation-conductive AE1 (point mutation H734R) (16). The involvement of critical amino acids for anion exchange activity in TM8 was assessed on cation transport. Moreover, we focused on the intracellular region connecting putative TM8 to TM9 which contains a highly conserved sequence among all SLC4 members as well as many positive and negative charges. The role of these charges and conserved amino acids was assessed by specific point mutations.

Our data suggest that the same ion pathway through the AE1 spanning domain is involved in either anion exchange or cation leak. Moreover, the connecting region between TM8 and TM9 seems to play a key role in ion selectivity of this pathway. Two key residues within this region are Lys-695 and Lys-698, which are required for the protein to operate as an anion exchanger. Substitution of either of these two lysines strongly reduces anion exchange and induces a Na^+ and K^+ transport.

These data greatly support the hypothesis that point mutated AE1 itself can transport cations. Moreover, this implies that only small changes are needed in the primary structure of AE1 to convert the transport mechanism of AE1 from an obligate exchanger to a channel.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of hAE1 cDNA with Point Mutations: P692L, K691Q, E693Q, R694/G/Q/D, K695L, K698C/G/D/Q, G699C, S700C, G701C/K, F702C, H703C, and D705C/G/K—Site-directed mutagenesis was performed on WT human erythroid AE1 cloned in pSP65 using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with primers covering 15 bases upstream and downstream the mutation (Eurogentec, Seraing, Belgium). One positive clone for each mutation was sequenced before further use (Beckman Cogenics, Takeley, UK). The plasmid with D705Y mutation has been described previously (16). The cysteine substitutions in putative TM8 (A666C, S667C, L669C, L673C, L677C, L680C, and I684C) were performed on WT AE1 and on H734R point-mutated AE1 with the same protocol.

Oocyte Injection—Isolation and cRNA injection of oocytes were performed as described previously (12). Briefly, HindIII-

linearized pSP65hAE1WT and mutant plasmids were transcribed by SP6 RNA polymerase (Ambion transcription kit). Female *Xenopus laevis* were anesthetized with MS222 according to the procedure recommended by our ethics committee.

Stage V–VI oocytes were injected with 10 ng of AE1 (WT and mutated) cRNA. Injected oocytes were maintained at 18 °C in MBS for 3 or 4 days before running the experiments. Modified Barth's saline (MBS composition in 85 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO_3 , 0.82 mM MgSO_4 , 0.33 mM $\text{Ca(NO}_3)_2$, 0.41 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 4.5 mM NaOH, pH 7.4, supplemented with 10 units/ml penicillin and 10 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin). For Na^+ and K^+ content measurements, oocytes were incubated in MBS with 0.5 mM ouabain and 5 μM bumetanide. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity, Na^+ and K^+ contents, Li^+ uptake, and pH_i measurements were determined simultaneously on the same batch of oocytes 3 or 4 days after injection.

Oocyte Na^+ and K^+ Content Measurements—As published previously (12), oocytes incubated in MBS with ouabain and bumetanide were quickly washed two times in 7.5 ml of MilliQ water (Millipore) and dried on aluminum foil overnight at 80 °C after removing excess extracellular fluid. Dried oocytes were weighed to determine dry cell solids. Intracellular ions were extracted by suspending dried oocytes in 4 ml of MilliQ water overnight at 4 °C. Measurements of sodium and potassium were done with flame spectrophotometer (Eppendorf). For each experiment, a triplicate was made for each condition, and results were expressed as micromoles/gram of dry cell solids.

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Exchange Activity Measurements—Oocyte intracellular pH was measured using selective microelectrodes as published previously (16). The ability of WT and mutant hAE1 to regulate intracellular pH was assessed by measuring intracellular pH of oocytes acidified by incubation in the following medium: 63.4 mM NaCl, 1 mM KCl, 24 mM HCO_3^- , 0.82 mM MgSO_4 , 0.33 mM $\text{Ca(NO}_3)_2$, 0.41 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.35, 5% CO_2 , 95% O_2 and then bathed with a MBS without Cl (63.4 mM sodium gluconate, 1 mM potassium gluconate, 24 mM HCO_3^- , 0.82 mM MgSO_4 , 0.74 mM $\text{Ca(NO}_3)_2$, 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.35, 5% CO_2 , 95% O_2). Results were given

in $\Delta p\text{H}_i/\text{min} \pm \text{S.E.}$ $\Delta p\text{H}_i$ was measured when acidified oocytes were exposed to Cl^- -free medium. It corresponds to the initial slope of the alkalization.

Thiolalkylations—Thiolalkylation of cysteines was performed by oocyte incubation for 15 min at room temperature in MBS with 0.2 mM parachloromercuribenzenesulfonate (PCMBs) or 5 mM 2-aminoethyl methane thiosulfonate hydrobromide (MTSEA) extemporaneously prepared from stock solutions 1 M in dimethyl sulfoxide stored at -20°C . For 2(trimethylammonium)ethyl methane thiosulfonate bromide (MTSET), it was weighted and solubilized in MBS at 5 mM just before use. After 15 min, oocytes were washed in MBS and assessed directly for lithium uptake experiments or $p\text{H}_i$ measurements.

Lithium Uptake—Lithium was used as a substitute for Na^+ to measure oocyte cation permeability. To prevent cation movements through the Na,K-ATPase or the $\text{Na,K 2Cl cotransporter}$, lithium uptake measurements were done in the presence of 5 μM bumetanide and 0.5 mM ouabain in LiNO_3 MBS (85 mM LiNO_3 , 1 mM KNO_3 , 2.4 mM NaHCO_3 , 0.82 mM MgSO_4 , 0.33 mM $\text{Ca(NO}_3)_2$, 0.41 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 4.5 mM NaOH , pH 7.4). In each experiment, seven oocytes/condition were incubated for 2 h in LiNO_3 MBS at 19°C . As described previously (16), lithium in oocytes was quantified by atomic absorption spectrometry with a PerkinElmer Life Sciences AAS3110.

AE1 Immunodetection on Oocyte Plasma Membrane—To detect AE1 addressed to oocyte plasma membrane, surface proteins of oocytes expressing WT or mutated AE1 were labeled with sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce) for 15 min in MBS, pH 8, at 4°C . The reaction was then quenched with buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4), and oocytes were washed in MBS, pH 8. Oocytes were then lysed mechanically in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM protease inhibitor Pefabloc (Roche Applied Science)), and oocyte membranes were prepared as published previously (30). The oocyte membranes were then solubilized in radioimmune precipitation assay buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM Pefabloc for 30 min at 4°C). Biotin-labeled proteins in the solubilized membranes were isolated by immobilization on avidin resin (Pierce) for 30 min at 4°C . After washing in radioimmune precipitation assay buffer, biotin-labeled proteins were eluted in SDS-PAGE loading buffer and analyzed on SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (Millipore), and probed with primary antibodies as indicated in the figure legends. Secondary antibodies were anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-coupled (Sigma) and detected by chemiluminescent reaction with Immobilon Western reagent (Millipore) and a Fusion FX7 (Vilber-Lourmat, France). To compare AE1 expression levels in different samples, the cell membrane marker $\beta 1$ Na,K-ATPase was used. The intensity of each AE1 band relative to the total membrane fraction ($\beta 1$ Na,K-ATPase signal) was quantified in each lane with National Institutes of Health ImageJ.

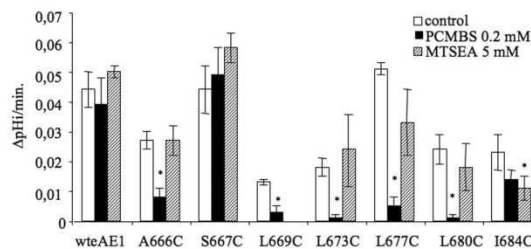


FIGURE 2. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity of WT AE1 and cysteine mutants. Oocytes were acidified by incubation in medium with 24 mM $\text{HCO}_3^-/5\% \text{CO}_2$; at equilibrium extracellular chloride was substituted by gluconate, which should induce an alkalization in presence of functional $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. The slope of the initial alkalization as a function of time was calculated from intracellular pH recording of oocytes expressing WT or different cysteine mutants. The oocytes were in control condition (no treatment by alkylating agents, white bars) or treated by 0.2 mM PCMBs (black bars) or 5 mM MTSEA (striped bars). Thiol reagent treatments were done in MBS for 15 min, and then oocytes were washed in MBS before $p\text{H}_i$ measurements. Data presented are means \pm S.E. (error bars) of 10 (wtAE1), 17 (A666C), 7 (S667C), 8 (L669C), 15 (L673C), 8 (L677C), 9 (L680C), and 11 (I684C) oocytes coming from two or three different batches. In supplemental Fig. 1 are presented traces of $p\text{H}_i$ recordings for oocytes expressing cysteine mutants with or without thiol reagents. For each mutant, Student's *t* test was performed to compare mean values in control condition or in presence of MTSEA or PCMBs. *, *p* < 0.05.

RESULTS

Cysteine Scanning Mutagenesis in Putative TM8—The cysteine scanning mutagenesis method relies on accessibility of substituted cysteine. Each residue in the membrane-embedded segments of the transport protein is mutated one at a time to Cys, the mutant is expressed in heterologous cells, and the susceptibility of these substituted cysteines to reaction with small/large, charged/neutral, sulfhydryl-specific reagents is determined. If application of the reagent results in an irreversible alteration of the function of the transporter, it is inferred that the substituted Cys reacted and, therefore, was exposed in the water-filled lumen of the transporter (31).

Introduction of cysteine in place of Ala-666, Ser-667, Leu-669, Leu-673, Leu-677, Leu-680, and Ile-684 was done in WT AE1 (containing two endogenous cysteines in the spanning domain) and in a cation conductive AE1 with the point mutation H734R (16). It was not possible to work with the Cys-less AE1 (kind gift from Dr. Joe Casey) because this was not expressed in the oocyte plasma membrane at a level allowing detection of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity. Thus, thiolalkylations were done in parallel, on control WT AE1 and on AE1 with specifically introduced cysteines. Thioalkylating agents with different charges and size were used: in order from the larger to the smaller: PCMBs (anionic), MTSET (cationic), or MTSEA (cationic and partially neutral 10/1 at pH 7.5, the neutral form is membrane-permeant and can react with intracellular accessible cysteines). Reaction of WT AE1 with thiolalkylating agents (PCMBs or MTSEA) did not change $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity, suggesting that the endogenous cysteines were not accessible to the reagents or located in a position not involved in anion exchange activity (Fig. 2). Positions Ala-666, Ser-667, Leu-669, Leu-673, Leu-677, Leu-680, and Ile-684 in putative TM8 have been proposed to line the anion translocation site in a Cys-less AE1, similar residues line the translocation site in NBCe (28, 29). To confirm these data in the *Xenopus*

AE1 Cation Leak

oocyte expression system, the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity was measured in oocytes expressing AE1 with the introduced cysteines in TM8 in the presence or absence of 5 mM MTSEA or 0.2 mM PCMBs (Fig. 2). Confirming the previous study in HEK293 cells (28), PCMBs was able to inhibit anion exchange in oocytes expressing A666C, L669C, L673C, L677C, and I680C AE1 mutants. No inhibition was observed with oocytes expressing I684C and S667C (in contrast to the previous study) (28).

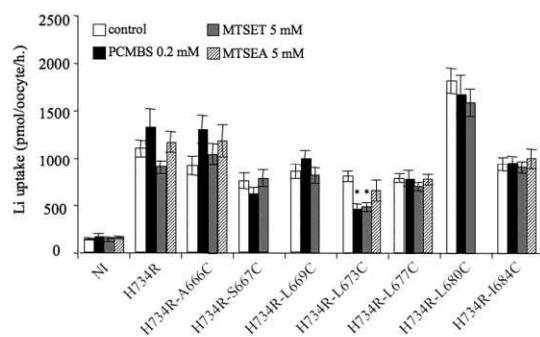


FIGURE 3. Li^+ uptake in oocytes expressing WT AE1, H734R single mutant, or H734R mutation with introduced cysteine in TM8. Just before the uptake experiment, oocytes were incubated for 15 min in MBS with different thiolalkylating agents (PCMBs, black bars; MTSET, gray bars; MTSEA, striped bars). The uptake was done in LiNO_3 medium with ouabain and bumetanide as mentioned under "Experimental Procedures." Data presented are means \pm S.E. (error bars) of 10–46 oocytes coming from 2–9 different experiments. *, $p < 0.05$ for each mutant at test comparing control condition (without any reagent) with MTSET, PCMBs, or MTSEA conditions.

MTSEA was able to block $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange significantly only in oocytes expressing the I684C mutant whereas Tang *et al.* (28) have also observed anion exchange inhibition (around 25%) by MTSEA on positions 673 and 677 in HEK293 cells.

The cation transport activity of AE1 mutant H734R with cysteines in TM8 was also assessed in presence or absence of three alkylating agents: PCMBs, MTSEA, and MTSET as shown in Fig. 3. The H734R mutant cannot exchange anions (Cl^- and HCO_3^-), and it was suggested that the mutation converts the electroneutral anion exchanger into a nonselective Na^+/K^+ conductance (16). None of the cysteine mutants on H734R AE1 was able to exchange anions (Cl^- and HCO_3^-). Moreover, introduction of cysteines along TM8 did not change the cation leak, and all the double mutants were cation-leaky (Fig. 3). Reaction with PCMBs, MTSEA, or MTSET did not significantly modify Li^+ uptake in any oocytes expressing the H734R mutant with A666C, S667C, L669C, L677C, L680C, or I684C substitutions. However, for oocytes expressing H734R/L673C, Li^+ uptake was significantly decreased by PCMBs ($-43 \pm 6\%$) and MTSET ($-42 \pm 6\%$).

Involvement of the Intracellular Region Connecting Putative TM8 and TM9 in Transport Properties—The alignment of SLC4 sequences from different species in the intracellular region between putative TM8 and TM9 of human AE1 shows a highly conserved sequence KGXGXHD among these different proteins, all of which are involved in bicarbonate transport (electroneutral anion exchangers AE1, AE2, AE3, and sodium bicarbonate cotransporters NBC; Fig. 4). In this motif, substi-

Species/transporter	Sequence identification	Amino acids	position
rabbit NBC	Q97915	NRKEHKLKKGAGYHLD	763
rat NBC	O35422	NRKEHKLKKGAGYHLD	763
Human NBC	O15153	NRKEHKLKKGAGYHLD	763
human NBC	O60350	NRKEHKLKKGAGYHLD	725
human NBC	O95233	NRKEHKLKKGAGYHLD	809
C. elegans	Q20642	NRKENLKLKKGAGYHLD	804
mouse NBC	O88343	NRKEHKLKKGAGYHLD	807
salamander NBCe	O13134	NRKEHKLKKGAGYHLD	763
chicken AE2	Q90710	SKKERMLQKGSGFHLD	999
human AE2	B3A2_HUMAN	SKKERMLQKGSGFHLD	1019
rabbit AE2	B3A2_RABIT	SKKERMLQKGSGFHLD	1016
mouse AE2	B3A2_MOUSE	SKKERMLQKGSGFHLD	1016
green puffer AE2	Q4RMY1	SKKERMLVKGSGFHLD	1063
zebra fish AE2	Q3KVL6	SKKERMLVKGSGFHLD	1007
skate AE2	Q7T1P5	SKKERMLTKGSGFHLD	996
guinea pig AE2	Q9Z0S8	SKKERMLQKGSGFHLD	1017
rat AE2	B3A2_RAT	SKKERMLQKGSGFHLD	1013
mouse AE3	B3A3_MOUSE	SQKARRLLKGSGFHLD	1007
human AE3	B3A3_HUMAN	SQKARRLLKGSGFHLD	1012
rat AE3	B3A3_RAT	SQKARRLLKGSGFHLD	1007
rabbit AE3	O18917	SQKARRLLKGSGFHLD	1013
Green puffer AE3	Q4SK68	SKKERMLVKGSGFHLD	554
skate AE3	Q7T1P4	SKKERMLVKGSGFHLD	998
human AE1	B3AT_HUMAN	SKPERKMKVKGSGFHLD	690
mouse AE1	B3AT_MOUSE	SKPERKMKVKGSGFHLD	708
rat AE1	B3AT_RAT	SKPERKMKVKGSGFHLD	706
trout AE1	B3AT_ONCMY	SKPERKMKVKGSGFHLD	703
chicken AE1	B3AT_CHICK	SKPERKMKVKGSGFHLD	701
zebra fish AE1	D1FTM8	SKPERKMKVKGSGFHLD	632
skate AE1	Q7P1P6	SKPDRKMKVKGSGFHLD	677
eelpout AE1	B2CX97	SKPERKMKVKGSGFHLD	632
Drosophila AE	Q9VT48	DKPDRGLKKGSGLHMD	
Anopheles AE	Q7PP75	DKPERGLKKGSGLHMD	
Conserved sequence in SLC4		KG X G X H D	
Conserved charges in AE1		+ - + + + -	

FIGURE 4. Alignment of conserved amino acids in the putative region between TM8 and TM9 (16 amino acids) in SLC4 family members. Identical amino acids are in bold characters, and conserved residues are in gray.

tution of the second Gly or the Asp in human AE1 (G701D and D705Y) is associated with a cation leak when expressed in *Xenopus* oocytes or in red cells as published previously (15). We substituted each of Lys-698, Gly-699, Ser-700, Gly-701, Phe-702, and His-703 with cysteine to assess the role of each amino acid of this sequence in AE1 transport properties. Moreover, the alignment shows an equivalent number of 4 positive

charges at the beginning of the putative intracellular loop (KPERKXXK in human AE1) and a negative charge at the end of the loop (Asp-705 in human AE1). There is also a conserved negative charge (Glu-693 in human AE1) between the four positive charges (except in mammalian AE3). To assess the involvement of these charges in human erythroid AE1 transport features, the following substitutions have been done: K691Q, E693Q, R694G/Q/D, K695L, K698G/Q/D, and D705C/G/K. The conserved Pro in AE1 sequences was also substituted (P692L). All of the mutated AE1 have been expressed in *Xenopus* oocytes, and their expression in the oocyte plasma membrane and their transport features (chloride/bicarbonate exchange and cation transport) have been assessed.

All of the studied mutants were expressed in the oocyte plasma membrane as shown in Fig. 5. The large error bars do not allow us to infer significant differences regarding plasma membrane expression between the mutants. This variability is mainly due to great differences between faint endogenous $\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase expression and overexpression of injected AE1. However, the signal associated with K698C/D/G/Q, D705C/Y mutants, was significantly lower than for WT AE1. This could reflect a lower expression level in the oocyte plasma membrane. Another explanation could be that the mutations impair biotin accessibility by remodeling extracellular loops, thus leading to lower level of biotin labeling.

The Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity of the different mutants was assessed as previously described (Fig. 6, white bars). After an acid load in CO₂/HCO₃⁻-buffered medium, the intracellular pH recovery in Cl-free medium as a function of time was plotted for the WT AE1 and the different mutants. It was observed that AE1 with the substitutions K691Q, P692L, E693Q, R694D/G/Q, G699C, S700C, G701C, F702C, H703C, and D705C/G were functional in terms of anion exchange. This suggests that these mutants were folded correctly to operate anion exchange. Conversely, all of the substitutions on Lys-698 strongly reduced the anion exchange capacity of the protein with a dramatic effect by Asp substitution. Similarly, the K695L mutation abolished anion exchange activity. The effect of substitutions on position Gly-701 depended on the introduced amino acid: G701K could not exchange Cl⁻ and HCO₃⁻ whereas G701C could. The same thing was observed with the Asp-705 mutants: substitution by Cys or Gly was functional for anion exchange,

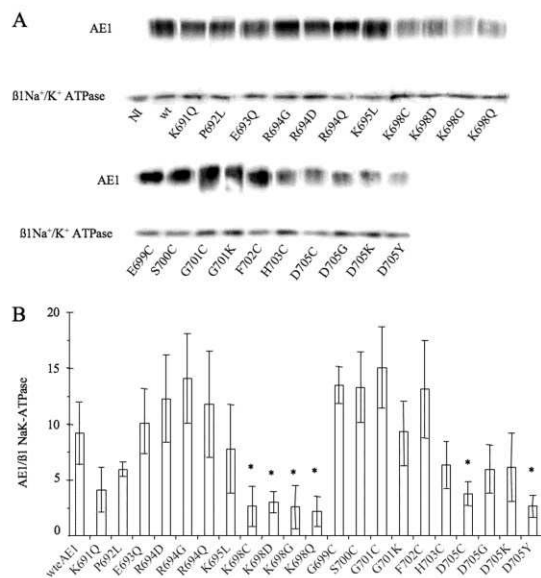


FIGURE 5. Immunodetection of WT and mutant AE1. A, Western blots for immunodetection of AE1 in biotin-labeled oocyte plasma membrane samples (upper row). Primary antibody was an anti-N-terminal domain of AE1 1/10,000 (CDB3, kind gift from Dr. P. Low). Lower row, immunodetection of $\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase (43 kDa) in the same samples (primary antibody clone M17-P5-F11, 1/250; Sigma). The figure combines three Western blots, showing all of the different AE1 constructs. The Western blots were chosen according to their similarity with the quantification data shown in Fig. 5B. B, quantification of AE1 level in plasma membrane normalized to $\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase signal. After corresponding background subtraction, pixels corresponding to AE1 signal were divided by pixels corresponding to $\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase signal in the same biotin-labeled sample. Each bar is a mean \pm S.E. (error bars) of at least three different Western blots corresponding to different batches of injected oocytes. Student's *t* test was performed comparing WT AE1 data with mutant AE1 data (*, *p* < 0.07).

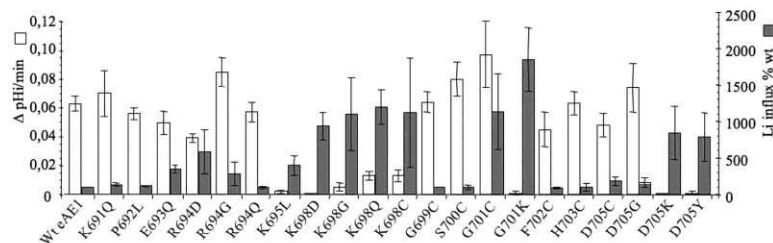


FIGURE 6. Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity and Li⁺ uptake in oocytes expressing WT or mutated AE1. White bars, Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity. The slope of initial alkalization in gluconate-CO₂/HCO₃⁻ medium was plotted as a function of time. Data are means \pm S.E. (error bars) of 4–42 oocytes (depending on mutants) coming from at least two experiments. Gray bars, Li⁺ uptake. Data are means \pm S.E. of at least three experiments (each of them with 7 oocytes/condition). To plot on a single figure data from different experiments with varying base line, in each experiment mean Li⁺ uptake for mutants was expressed as a percent of control oocytes (noninjected or expressing WT AE1). Mean \pm S.E. Li⁺ uptake was in pmol/oocyte per h: 106 \pm 99 (*n* = 34 experiments) for NI and 71 \pm 64 (*n* = 28 experiments) for WT AE1. Statistical analyses of the data have been done with Student's *t* test comparing fluxes between WT and mutant-expressing oocytes.

AE1 Cation Leak

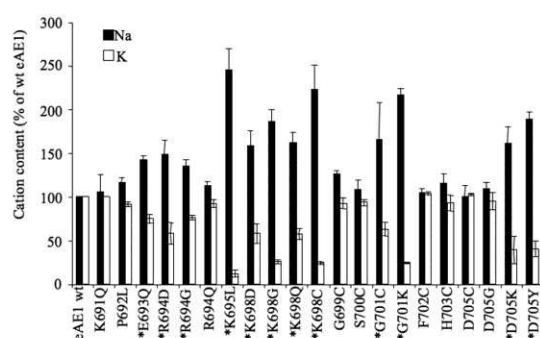


FIGURE 7. **Oocyte Na⁺ and K⁺ contents.** Na⁺ and K⁺ contents of oocytes expressing WT or mutated AE1 are shown. Data are means \pm S.E. (error bars) of at least three experiments. For each single experiment, measurements were done on triplicate for each condition and mean Na⁺ or K⁺ contents were expressed in percent of control oocytes (noninjected or expressing WT AE1). Student's *t* test was performed to compare data from mutant-expressing oocytes with WT-expressing oocytes (*, *p* < 0.07).

whereas Lys or Tyr substitutions were not. This lack of anion exchange activity did not result from a defect in processing to the oocyte plasma membrane as shown in Fig. 5. However, a lower anion exchange activity could be due to a reduced number of protein at the cell surface. Because some substitutions on Lys-698 exhibit a faint but significant anion exchange activity, it remains possible that a better expression of these mutants at the plasma membrane would have increased the anion exchange activity. However, for a similar expression level, D705C exhibits a much better anion exchange activity than Lys-698 mutants, for instance. Thus, it is quite difficult to correlate the expression level to the intensity of the exchange activity but the absence of anion exchange activity is not due to the absence of AE1.

The cation permeability of oocytes expressing the different mutants was then assessed by measuring Li⁺ uptake (Fig. 6, gray bars). A significant increase in Li⁺ permeability is observed for mutants E693Q, R694D/G, K695L, K698D/G/Q/C, G701C/K, D705K/Y (*p* < 0.05). All of the studied mutants were able to induce anion exchange activity and/or Li⁺ uptake. However, there is no correlation between the level of AE1 expression in oocyte plasma membrane and the intensity of anion exchange activity or Li⁺ uptake. Similar membrane expression levels give different amounts of anion exchange activity: G701C versus G701K mutants, for instance. The reduced accumulation of Lys-698 mutants in plasma membrane is associated with low anion exchange activity and with high Li⁺ permeability of oocytes expressing these mutants. In contrast, E693Q, R694D, R694G, and G701C exhibit a lower cation leak and higher anion exchange whereas they are more abundant in oocyte plasma membrane than Lys-698 mutants.

The increased Li⁺ permeability is correlated with changes in oocyte cation content as illustrated in Fig. 7. Fig. 7 illustrates the cation contents of oocytes expressing the different AE1 mutants. To plot on a single figure the data coming from different experiments with varying base lines, it was decided to express the data as percents of control. In each experiment, 100% was assigned to the control, i.e. noninjected oocytes or

WT AE1-expressing oocytes, and values for oocytes expressing mutated AE1 were calculated compared with these controls. This allowed us to normalize the data between the different experiments, and the data presented are means \pm S.E. The statistical significance of Na⁺ and K⁺ changes was determined on each individual experiment by a *t* test comparing mean values of Na⁺ or K⁺ contents between mutant and WT expressing oocytes. The mean values for Na⁺ and K⁺ contents were not statistically different between NI oocytes and oocytes expressing WT AE1 (in μ mol/g of dry weight, Na⁺: 48 ± 11 (NI, *n* = 31), 52 ± 13 (WT AE1, *n* = 25); K⁺: 86 ± 17 (NI, *n* = 31), 75 ± 18 (WT AE1, *n* = 25). From these data, mutated AE1 with the following amino acid substitutions E693Q, R694D/G, K695L, K698D/G/Q/C, G701C/K, as well as D705K/Y exhibit a significant cation leak (*p* < 0.05). In contrast, substitutions K691Q, P692L, G699C, S700C, F702C, H703C, and D705C/G did not induce any significant Na⁺ and K⁺ change.

Thus, along the intracellular loop between putative TM8 and TM9, positions Glu-693, Arg-694, Lys-695, Lys-698, Gly-701, and Asp-705 seems to play an important role in the transport features of the protein, either inducing a cation permeability and abolishing or dramatically decreasing anion exchange (K698D/G/C/Q, G701K, and D705K/Y mutants) or inducing a cation permeability in a still functional anion exchanger (E693Q, R694D/G, G701C). In contrast, positions Lys-691, Pro-692, and Gly-699, Ser-700, Phe-702, and His-703 in the conserved consensus site could be substituted without any significant change in AE1 transport properties: anion exchange was maintained, and no cation permeability appeared. Comparison of Cl[−]/HCO₃[−] exchange and Li⁺ uptake shows that a significant increase in Li⁺ uptake is associated with a decrease in Cl[−]/HCO₃[−] exchange activity (Fig. 6). Three noticeable exceptions to this rule are mutants E693Q, R694D, and G701C, which keep a high anion exchange activity and induce a Li⁺ permeability compared with WT AE1.

DISCUSSION

Involvement of AE1 TM8 in Anion Exchange and Cation Leak—A model for the anion translocation pore in AE1 has been proposed by Tang *et al.* (28). According to their observations, a pore for anion exchange through the AE1 membrane-spanning domain is widely opened on the extracellular side and involves TM8. At the intracellular part of putative TM8, residue Glu-681 was proposed to interact with transported anions, to be accessible from either side of the membrane, and to reside at the transmembrane permeability barrier (32). Tang *et al.* (28) identified residues lining the transmembrane translocation pore above and below Glu-681 and showed that this transport site forms an outward facing funnel that narrows to a permeability barrier at Glu-681. Our data of cysteine mutants in TM8 expressed in *Xenopus* oocytes generally confirmed the observations of Tangs *et al.* (28) in HEK293 cells. We showed that PCMBs blocked anion exchange when fixed in positions 666, 669, 673, 677, and 680 whereas MTSEA, which is smaller, failed to do so. This may be because these amino acids were not accessible to MTSEA. Alternatively, it may be that at pH 7.5 MTSEA is mainly positive and could not easily reach these positions in an anion-selective transporter. However, Tang *et al.* (28) were

able to observe approximately 25% inhibition of anion exchange by MTSEA on positions Cys-673 and Cys-677. Moreover, the S667C mutant was slightly inhibited by PCMBs (18%) in HEK293 cells whereas it is not sensitive in *Xenopus* oocytes. These differences in results may be because of the slightly different shape or size adopted by the mutant protein in the different plasma membrane environments of oocytes and HEK cells or because the Tang *et al.* (28) study used a cysteine-less protein. However, our data strongly suggest that in *Xenopus* oocytes as in HEK cells, AE1 TM8 forms part of the anion translocation pore.

In the cation leaky AE1 (mutant H734R), which is unable to exchange Cl^- and HCO_3^- , PCMBs and MTSET were able to block lithium uptake when fixed on position Cys-673. This strongly suggests that the anion exchange pathway involving TM8 is also involved in the cation leak. Moreover, the shape of the cation pathway is also probably similar to a funnel as for the anion exchange pathway. The inhibition of cation transport by PCMBs or MTSET on C673R/H734R mutant is lower than the inhibition of anion exchange by these reagents on the single Cys-673 mutant. This suggests that the transport pathway in the C673R/H734R, cation-leaky mutant, is still large enough for a few cations to move despite the presence of PCMBs or MTSET. In agreement with this interpretation, the smaller reagent MTSEA failed to block cation movement in L673C/H734R mutant. PCMBs does not block cation movement on cysteine 677 and 680, suggesting that these positions are not accessible in the cation-leaky conformation. A constriction in AE1 transport pathway around position Leu-673 could be induced by H734R mutation, thus changing AE1 transport selectivity.

Role of Intracellular Region between TM8 and TM9 in Ion Selectivity and Transport Mechanism of AE1—Until now, the cation leak and impaired anion exchange activity of mutated AE1 have been linked to human hereditary pathologies and associated with cation leaky red cells (except for mutations involved in distal renal tubular acidosis). With the present work, we extend the list of point mutations able to induce a cation leak and to impair anion exchange function, to positions not known to be associated with pathologies (Glu-693, Arg-694, Lys-695, and Lys-698). These residues are located in the putative intracellular region between TM8 and TM9. Our data show that this domain contains highly important residues for anion exchange activity. It has been suggested that this intracellular domain starts with a helical structure at basement of helix 8 below the lipid bilayer (26, 28). Thus, it is proposed that changes in amino acid residues in this domain could alter TM8 spatial organization and consequently impair AE1 transport features. This intracellular domain contains a conserved sequence among SLC4 members (KG-G-H-D). Interestingly, substitution by cysteine of Gly-699 and His-702 in this sequence did not affect significantly anion exchanger function. However, substitutions on positions Lys-698, Gly-701, and Asp-705 greatly affect AE1 function. Thus, this conserved sequence must play a critical role in SLC4 transport features. There are many charged amino acids in the whole intracellular region between TM8 and TM9 which could be important for AE1 functioning. Indeed, substitutions on Glu-693, Arg-694, Lys-695 as well as Lys-698 and Asp-705 discussed above, mod-

ified transport characteristics of AE1 whereas substitution on Lys-691 failed to do so, suggesting that this charge is neither involved in anion exchange function nor in cation leak.

The functional consequences of amino acid substitutions on positions Glu-693, Arg-694, Lys-695 and Lys-698, Asp-705, and Gly-701 let us propose a possible function for these residues in AE1 transport features. Substitutions on Glu-693 and Arg-694 do not impair anion exchange activity but induce a small cation leak, depending on the size of the amino acid substitution: the R694Q mutant is similar to WT AE1, its substitution by a negative charge (Asp) induces a cation leak as does the substitution by a small, non polar amino acid (Gly). Thus, Glu-693 and Arg-694 are not involved as charges in anion exchange conformation of the protein but could play a steric role to prevent cation leak. In contrast, it is not possible to substitute Lys-695 or Lys-698 without dramatically impairing the anion exchange function and inducing an important cation leak. An interpretation of this observation could be that these two positive charges form a selectivity filter for intracellular anions and are required to observe anion exchange: as soon as one of them is substituted, exchange is reduced, and cation transport appears.

Position Asp-705 is similar to Arg-694: its substitution by Cys or Gly neither altered anion exchange nor induced cation leak; however, its substitution by Lys or Tyr induced a cation leak and abolished anion exchange. Thus, it could be proposed that the Asp-705 charge is also not critical for anion exchange to operate; however, this position could favor cation transport depending on the size or charge of the amino acid substitution.

Finally, position Gly-701 is critical for AE1 transport features but also for its recognition by chaperones involved in plasma membrane trafficking: its substitution by Asp impairs trafficking to plasma membrane as shown by Yenchitsomanus *et al.* (33) and induces a cation leak in a still functional anion exchanger (18). The present data show that its substitution by Lys converts the exchanger into a cation leak whereas its substitution by Cys induces a cation leak in a still-functioning anion exchanger. Other point mutations in AE1 were shown to induce a cation leak in still-functional anion exchangers; however coexpression with AE1 chaperone glycophorin A was required to obtain significant expression to plasma membrane (17–19). This suggests that these point mutations have a more dramatic effect on AE1 conformation than that required to cause a cation leak. With the G701C mutant, there was no impaired trafficking, and the protein conducted the two transport activities, confirming that they are not mutually exclusive. Thus, if the same transport domain in AE1 is involved in both anion exchange and the cation leak, the two transport processes could function independently: the anion exchange could operate with or without the cation leak and *vice versa*.

To conclude, a schematic model for the AE1 transport site can be proposed, containing an outwardly opened funnel through lipid bilayer with a barrier for anion exchange involving Glu-681 (Fig. 8) and an intracellular selectivity filter with two positive charges repelling cations (Lys-695 and Lys-698). Modification of these charges enables cation access to the transport site which is cation leaky.

Present and already published data show that the anion exchange mechanism can function simultaneously with the

AE1 Cation Leak

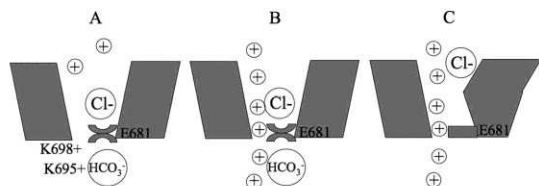


FIGURE 8. Proposed schematic view of AE1 transport conformations. A, anion exchange conformation. The two lysines in extracellular loop between TM8 and TM9 prevent cation leak. B, anion exchange with cation leak conformation. The two lysines moved away and exposed a pore for cation connecting both sides of the membrane; the anion exchange site is not impaired. C, cation leak conformation. Positive charges Lys-695 and Lys-698 moved away in cation leaky conformation, and anion exchange activity is turned down by funnel deformation, for instance.

cation leak, suggesting that the pathway itself does not discriminate charges. The $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange should take place around Glu-681 while cations move independently of this barrier in a narrow channel along the anion exchange site. This allows us to suggest a transport mechanism between channel and transporter: conformational changes allowing anion exchange with outward and inward open forms (ping-pong model) (35) should be limited in amplitude, leaving open a channel permeable to cations. As observed, this anion exchange mechanism can easily be broken and converted into the cation leak. Thus, AE1 transport site exhibits at least three functional states: anion exchange (Fig. 8A), anion exchange and cation leak (Fig. 8B), and cation leak (Fig. 8C).

To account for the three transport states we would hypothesize that there must be changes in Lys-695 and Lys-698, responsible for transport selectivity, and also in the anion exchange mechanism. A single point mutation could simultaneously induce both these two changes or just the first one. Crystallographic studies on AE1 may one day confirm this picture of AE1 transport site functioning. However, it should be noted that the recent publication of the reconstruction of an outward open human erythrocyte AE1 revealed a hole through the AE1 membrane-spanning domain, connecting intra- and extracellular media (34).

The probability to open a cation leak in AE1 is increased by some specific point mutations, but it could be envisioned that other physiological or pathological agents, still unknown, could mimic the effects of the mutations on the transport conformation. This raises the question of cell membrane potential control with the existence of a potential cation leak within an electroneutral anion exchanger.

Acknowledgment—We thank Dr. Lesley Bruce for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Yool, A. J., and Weinstein, A. M. (2002) *News Physiol. Sci.* **17**, 68–72
2. Ryan, R. M., and Vandenberg, R. J. (2005) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32**, 1–6
3. DeFelice, L. J., and Goswami, T. (2007) *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 87–112
4. Larsson, H. P., Picaud, S. A., Werblin, F. S., and Lecar, H. (1996) *Biophys. J.* **70**, 733–742
5. Vandenberg, R. J., Huang, S., and Ryan, R. M. (2008) *Channels* **2**, 51–58
6. Takeuchi, A., Reyes, N., Artigas, P., and Gadsby, D. C. (2008) *Nature* **456**, 413–416
7. Lisal, J., and Maduke, M. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 805–810
8. Miller, C. (2006) *Nature* **440**, 484–489
9. Bamberg, E., and Passow, H. (1992) in *Progress in Cell Research*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York
10. Fiévet, B., Gabillat, N., Borgese, F., and Motais, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 5158–5169
11. Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fiévet, B., and Motais, R. (1996) *Cell. Mol. Biol.* **42**, 985–994
12. Guizouarn, H., Gabillat, N., Motais, R., and Borgese, F. (2001) *J. Physiol.* **535**, 497–506
13. Motais, R., Guizouarn, H., and Garcia-Romeu, F. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1075**, 169–180
14. Guizouarn, H., and Motais, R. (1999) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **276**, C210–C220
15. Bruce, L. J., Robinson, H. C., Guizouarn, H., Borgese, F., Harrison, P., King, M. J., Goede, J. S., Coles, S. E., Gore, D. M., Lutz, H. U., Ficarella, R., Layton, D. M., Iolascon, A., Ellory, J. C., and Stewart, G. W. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 1258–1263
16. Guizouarn, H., Martial, S., Gabillat, N., and Borgese, F. (2007) *Blood* **110**, 2158–2165
17. Ellory, J. C., Guizouarn, H., Borgese, F., Bruce, L. J., Wilkins, R. J., and Stewart, G. W. (2009) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**, 189–194
18. Walsh, S., Borgese, F., Gabillat, N., Unwin, R., and Guizouarn, H. (2008) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F343–F350
19. Walsh, S., Borgese, F., Gabillat, N., and Guizouarn, H. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 668–672
20. Wrong, O., Bruce, L. J., Unwin, R. J., Toye, A. M., and Tanner, M. J. (2002) *Kidney Int.* **62**, 10–19
21. Delaunay, J. (2004) *Semin. Hematol.* **41**, 165–172
22. Stewart, G. W. (2004) *Curr. Opin. Hematol.* **11**, 244–250
23. Tanner, M. J. (2002) *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 133–139
24. Groves, J. D., and Tanner, M. J. (1999) *Biochem. J.* **344**, 699–711
25. Fujinaga, J., Tang, X. B., and Casey, J. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6626–6633
26. Zhu, Q., Lee, D. W., and Casey, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3112–3120
27. Tang, X. B., Fujinaga, J., Kopito, R., and Casey, J. R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22545–22553
28. Tang, X. B., Kovacs, M., Sterling, D., and Casey, J. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3557–3564
29. McAlear, S. D., and Bevensee, M. O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 32417–32427
30. Martial, S., Guizouarn, H., Gabillat, N., Pellissier, B., and Borgese, F. (2006) *J. Cell. Physiol.* **207**, 829–835
31. Frillingos, S., Sahin-Tóth, M., Wu, J., and Kaback, H. R. (1998) *FASEB J.* **12**, 1281–1299
32. Jennings, M. L., and Smith, J. S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13964–13971
33. Yenchitsomanus, P. T., Kittanakom, S., Rungroj, N., Cordat, E., and Reithmeier, R. A. (2005) *J. Mol. Genet. Med.* **1**, 49–62
34. Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., and Mitsuoka, K. (2010) *J. Struct. Biol.* **169**, 406–412
35. Knauf, P., Restrepo, D., Liu, S., Mendoza Raha, N., Spinelli, L., Law, Y., Cronise, B., Snyder, R., and Romanov, L. (1992) in *The Band 3 Proteins: Anion Transporters, Binding Proteins and Senescent* (Bamberg, E., and Passow, H., eds) pp. 35–44, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York

7.4.2 Article 2 : Band 3 missense mutations and stomatocytosis: insight into the molecular mechanism responsible for monovalent cation leak.

Hindawi Publishing Corporation
International Journal of Cell Biology
Volume 2011, Article ID 136802, 8 pages
doi:10.1155/2011/136802

Review Article

Band 3 Missense Mutations and Stomatocytosis: Insight into the Molecular Mechanism Responsible for Monovalent Cation Leak

Damien Barneaud-Rocca,^{1,2} Bernard Pellissier,^{1,2}
Franck Borgese,^{1,2} and Hélène Guizouarn^{1,2}

¹Institut de Biologie du Développement et Cancer, UMR6543, CNRS, 28 Avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

²Institut de Biologie du Développement et Cancer, Université de Nice, 06108 Nice Cedex 2, France

Correspondence should be addressed to Hélène Guizouarn, guizouar@unice.fr

Received 6 April 2011; Revised 27 May 2011; Accepted 29 May 2011

Academic Editor: Lars Kaestner

Copyright © 2011 Damien Barneaud-Rocca et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Missense mutations in the erythroid band 3 protein (Anion Exchanger 1) have been associated with hereditary stomatocytosis. Features of cation leaky red cells combined with functional expression of the mutated protein led to the conclusion that the AE1 point mutations were responsible for Na⁺ and K⁺ leak through a conductive mechanism. A molecular mechanism explaining mutated AE1-linked stomatocytosis involves changes in AE1 transport properties that become leaky to Na⁺ and K⁺. However, another explanation suggests that point-mutated AE1 could regulate a cation leak through other transporters. This short paper intends to discuss these two alternatives.

1. Introduction

Band 3 or anion exchanger 1 (AE1) is the major red cell membrane protein. It belongs to the Solute Carrier 4A family (SLC4A) grouping bicarbonate transporters [1–3]. This protein catalyzes electroneutral chloride-bicarbonate exchange and it is also expressed in kidney α -intercalated cells and in cardiomyocytes [4, 5]. In red cells it is involved in two main tasks: enhancement of carbon dioxide transport and structuration of cell shape. It is found in red cells from all vertebrates except lampreys which naturally do not express erythrocyte AE1 [6]. Besides this exception, its complete absence from mammalian red cells leads to red cell defects which consequences on health depends on the species. Dyserythropoiesis, severe haemolytic anaemia and often premature death have been reported in mouse [7] and human [8] whereas cow or zebra fish seems to better withstand red cell AE1 deficiency [9, 10].

In human, many different mutations in *SLC4A1* gene coding for AE1 have been reported [11]. Some of them are asymptomatic whereas some others are associated with red cell pathologies characterized by alteration of red cell shape and rheological properties. As this protein is also expressed

in kidney, a renal phenotype can be associated with *SLC4A1* mutations. In this review we will focus on red cell AE1 and the reader interested in kidney AE1 is therefore addressed to very exhaustive recent reviews on this subject [12–15].

When a red cell phenotype is associated with *SLC4A1* mutations the symptoms are hyper haemolysis and anaemia, icterus, splenomegaly. However, these symptoms may vary widely in intensity. It appears that the *SLC4A1* mutations can be divided into two classes according to the way they impair AE1 function: (1) those that prevent correct folding of the protein so that it is not addressed to plasma membrane. This leads to a lower amount of AE1 in red cell membrane that impairs connection of skeleton and membrane, a feature of hereditary spherocytosis condition [16, 17].

(2) those that are associated with an increased cation permeability of red cell membrane. This latter condition is the hallmark of hereditary stomatocytosis [18, 19].

Since the initial discovery that 5 point mutations in *SLC4A1* gene (responsible for: L687P, D705Y, S731P, H734R or R760Q substitutions in AE1) were associated with increased red cell Na⁺ and K⁺ leak [20], 4 other point mutations associated with similar red cell phenotype have been reported (G796R, E758K, S762R, R730C) [21–24]. It has

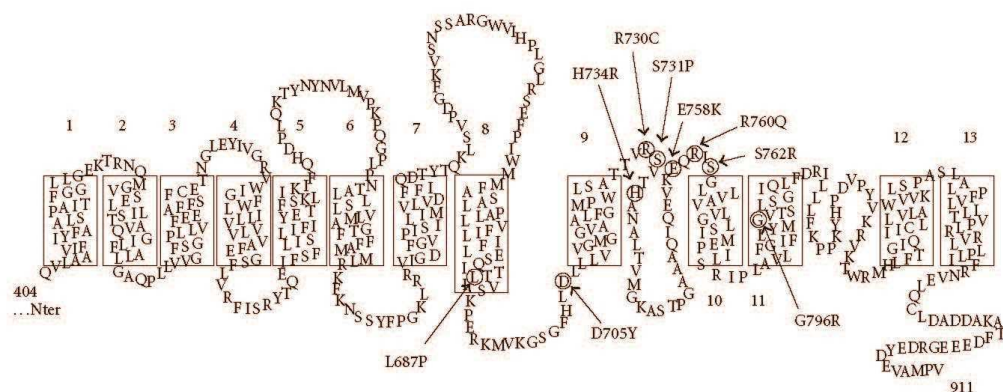


FIGURE 1: Topology of the membrane spanning domain of human AE1 with 13 α helices, according to Zhu et al. [29]. Amino-acids that are substituted in response to the different point mutations in AE1 gene are labelled by circles. Each of these mutations is associated with hereditary haemolytic anaemia characterized by cation leaky red cells.

been proposed that the molecular mechanism accounting for cation leaky red cells in these hereditary stomatocytoses was a change in AE1 transport properties induced by the point mutations. The exchanger itself mediates cation leak by a conductive mechanism [25]. However, this interpretation leads to dramatically change our way of thinking about band 3 transport mechanism. Moreover, the transport features of some of these AE1 mutants, lead to another interpretation, that is cation leak is due to the activation of endogenous Na^+ and K^+ transporters (or channels) in red cell membrane by mutated AE1 [23, 24, 26]. This short review intends to discuss the molecular mechanism of red cell cation leak associated with AE1 point mutations in hereditary stomatocytosis.

1.1. Position of Amino Acid Substitutions in AE1 Polypeptide. AE1 polypeptide can be divided in 3 functional domains: a cytoplasmic amino-terminal domain, about 400 amino acids, interacting in red cells with various enzymes, haemoglobin, ankyrin and band 4.2; a membrane spanning domain where anion exchange takes place and a short carboxy terminal end in the cytoplasm that associates with carbonic anhydrase II [27]. The protein forms part of a macrocomplex, combining membrane and cytoplasmic proteins that is thought to improve the efficiency of gas transport by red cells [28].

Figure 1 illustrates the position of each of the point mutations that have been identified in patients with cation leaky red cells. The substitutions concern highly conserved amino acids among known electroneutral anion exchangers (SLC4A1, A2 and A3) and they are all located in the membrane spanning domain.

1.2. Point Mutated AE1 and Permeability Features. The permeability of red cells from patients bearing heterozygous mutation on AE1 has been investigated and the transport

features of the point mutated AE1 have been studied by expression in amphibian oocytes. Thus in most cases, it was possible to combine data from red cells to data from heterologous expression system. These data are presented here and will be discussed in the third part. Table 1 summarized the main features of cation leaky red cells and mutated AE1.

The red cell leaks Na^+ and K^+ by a ouabain and bumetanide resistant mechanism that is temperature dependent, it is increased by temperatures below 37°C . This has been extensively studied in red cells of patients heterozygous for L687P, D705Y, S731P, H734R, R760Q and S762R AE1 mutants [20, 21]. The diffusion of K^+ and Na^+ according to their electrochemical gradients leads to osmotic fragility of the red cells. At body temperature, the cation leak can be more or less compensated depending on the mutants. An artefactual rise in plasma K^+ (pseudohyperkalaemia) can be observed after cooling blood to room temperature [30]. The shape of cation leak temperature dependence is not identical between the mutants [20] and the morphology of red cells also shows some differences between patients: blood smears exhibit stomatocytes or spherocytes. In red cells with H734R or G796R AE1 mutations, an increased activity of $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter, K^+-Cl^- cotransporter, Na^+/H^+ exchanger or $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger has been reported [22, 26]. R730C mutant is also associated with increased activity of Na^+/H^+ exchanger and Na^+/K^+ -pump, whereas the Gardos channel fluxes are reduced [23]. Thus, the red cell permeability results from both, the monovalent cation leak induced by AE1 point mutations and the activity of solute carriers that have been stimulated by the initial Na^+ and K^+ movements. The regulation of these other carriers could differ between patients as well as how the body cope with cation leaky red cells. This could explain variations in patient's phenotypes (Table 1).

For all the studied patients, the abundance of AE1 in red cells is grossly normal. However, the anion permeability of these cells is decreased suggesting a loss of anion exchange

TABLE 1: Features of cation leaky red cells and point mutated AE1.

AE1 point mutation	Red cell shape	Abundance of AE1 (band 3) in red cell membrane ¹	Red cell cation leak rate at 0°C (multiple of normal) ¹	Anion exchange activity of mutated AE1 ²	Pharmacology of the red cell cation leak	Pharmacology of the cation leak in heterologous expression system (cation conductance or cation flux)
L687P	Stomatocyte	82%	7-8	abolished	NS1652, SITS, dipyridamol	Cation conductance: SITS, Zn ²⁺ , La ³⁺ sensitive
D705Y	Spherocyte	77%	8	abolished	NS1652, SITS, dipyridamol	Cation conductance: SITS, Zn ²⁺ , La ³⁺ sensitive
R730C	Stomatocyte	normal	6 (at 37°C)	abolished	NT	NT
S731P	Stomatocyte	79%	30–57–58–87	abolished	NS1652, SITS, dipyridamol	Cation conductance: SITS, Zn ²⁺ , La ³⁺ sensitive
H734R	Stomatocyte	74–82%	87–94	abolished	NS1652, SITS, dipyridamol	Cation conductance: SITS, Zn ²⁺ , La ³⁺ sensitive Rb flux: DIDS, Zn ²⁺ , Gd ³⁺ sensitive
E758K	Sphero-stomatocyte	Mild deficiency	NT	Normal with GPA coexpression	NT	Conductance: Zn ²⁺ , SITS and WW-781 sensitive
R760Q	Spherocyte	85–92%	4–6	74% of wt (with GPA)	NS1652, SITS, dipyridamol	NT
S762R	Stomatocyte	NT	7	abolished	NT	NT
G796R	Stomatocyte	normal	NT	abolished	NT	Li uptake insensitive to SITS or H ₂ DIDS

This table summarized data collected from different publications. For L687P, D705Y, S731P, H734R: [20, 25]. For R730C: [23]. For E758K: [24]. For R760Q: [20, 31]. For S762R: [21]. For G796R: [22]. NT: not tested.

¹Each number refers to features of red cells from different patients carrying the same AE1 mutation.

²The anion exchange was assessed in amphibian oocyte expressing the mutated AE1. The loss of anion exchange is confirmed in heterozygote red cells by $\approx 50\%$ decreased anion flux.

function of the protein [20]. Indeed, functional characterization of L687P, D705Y, R730C, S731P, H734R, S762R and G796R mutants expressed in xenopus oocytes shows that they are no more able to exchange Cl⁻ and HCO₃⁻ [21, 25]. In contrast E758K and R760Q mutants keep an anion exchange activity [24, 31]. Another interesting difference for these two mutants is that their abundance in plasma membrane is highly dependent on glycophorin A (GPA) co-expression. GPA is known to bind AE1 and to act as a chaperone. Moreover this interaction stimulates AE1 transport activity [32–34].

Very few studies are available about conductance of these stomatocytic red cells. Only conductance of red cells from two patients with R730C or H734R mutation on AE1 has been reported. Patch current recordings on 3 red cells from a patient with R730C AE1 mutation do not allow to detect increased cation conductance compared to normal red cells [23]. Similar conclusions have been drawn from conductance analyses on red cells with H734R AE1 mutation [26].

Expression of L687P, D705Y, S731P, H734R, R760Q, S762R or G796R AE1 mutants in xenopus oocytes induces a reversal in xenopus oocyte Na⁺ and K⁺ contents after 3 days in medium with ouabain and bumetanide. This cation

leak is associated with increased ouabain and bumetanide-resistant Rb⁺ or Li⁺ uptake which is similar to the red cell cation leak [20–22]. The Na⁺ and K⁺ transport associated with AE1 missense mutations shows independent movement of Na⁺ and K⁺ with a 1 for 1 stoichiometry. Moreover, when assessed, a conductance has been associated with these cation movements. Thus the molecular mechanism responsible for the observed cation movement is a channel like transport mechanism [25].

Pharmacology of transport activities of the mutants have been assessed in red cells or in heterologous expression systems. DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2',-disulfonate) has long been known to inhibit anion exchange at micromolar concentrations [35, 36]. Moreover, sulfonate radical of DIDS can link two different lysines (K539 and K851) in putative transmembrane helices (TM) 5 and 12 of AE1 membrane spanning domain [36]. It is thus possible to covalently bind DIDS on each or both of these two lysines. The DIDS derivative SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanato-2,2'-stilbene disulfonate), flufenamic acid and niflumic acid are also potent inhibitors of AE1 activity. It is observed that the point mutations impair the protein sensitivity to classical anion exchanger inhibitors. For instance, S731P

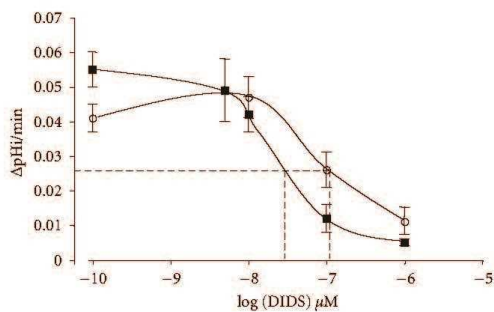


FIGURE 2: Dose response curves of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by DIDS. The capacity of oocytes expressing wt AE1 or R760Q mutant (10 ng cRNA co-injected with 2.5 ng GPA-cRNA in both cases) to alkalinize in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ buffer without extracellular Cl^- (gluconate medium) was assessed in presence of different DIDS concentrations. The initial slope of alkalinization as a function of time was plotted against DIDS concentrations. The method used was described in a previous publication [25]. Data are means \pm s.e.m. of 9 to 20 oocytes from different batches. Black symbols correspond to wt AE1 expressing oocytes, empty circles to R760Q mutant expressing oocytes.

mutation prevents DIDS covalent binding to the exchanger [20]. For the two mutants keeping anion exchange activity, the DIDS sensitivity of the transport is also impaired. Figure 2 illustrates $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange as a function of DIDS concentrations for R760Q mutant compared to wt AE1. The R760Q mutation decreases AE1 DIDS sensitivity as shown by the right shift of the dose-response curve. The anion uptake mediated by E758K mutant is also less sensitive to DIDS than wtAE1 [24].

Pharmacology of the cation leak induced by AE1 point mutations has also been investigated. Inhibition of the Na^+ and K^+ leak induced by L687P, D705Y, S731P, H734R and R760Q mutations has been observed in red cells with SITS, dipyrindamole and NS1652 also known to block anion exchanger [20]. Pharmacology of the cation leak is difficult to assess in xenopus oocytes since endogenous cation permeabilities could be activated by common AE1 inhibitors such as DIDS or niflumic acid [37, 38]. However, inhibition of the Na^+ and K^+ conductance induced by expression of mutated AE1 was observed with SITS and plurivalent cations such as Zn^{2+} , La^{3+} and Gd^{3+} [24, 25].

Amongst AE1 point mutations associated with cation leaky red cells, two mutants (R730C and E758K) exhibit peculiar transport features in amphibian oocytes. R730C AE1 mutant induces only a weak ouabain and bumetanide resistant cation leak in xenopus oocytes. It is not possible to measure a significant increase in ouabain and bumetanide-resistant $^{86}\text{Rb}^+$ uptake and only a ≈ 2.5 fold increase in Li^+ uptake is observed (to compare to ≈ 8 fold increase in oocytes expressing S731P mutant for instance). Moreover expression of R730C mutant is associated with an increased activity of the Na^+/K^+ ATPase [23]. For E758K mutant permeability features depend on the expression system. It has

been studied in two different amphibian oocytes, xenopus and ambystoma. In both species, its abundance in plasma membrane is dependent on the coexpression of GPA. The mutant keeps anion exchange activity and induces a $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in both systems. However, it appears that this Rb permeability is not correlated to the expression level of the mutant when expressed in ambystoma: the higher number of transporters when coexpressed with GPA does not induce a higher ^{86}Rb uptake. The expression of E758K mutant also slightly increases xenopus oocyte conductance but this conductance does not account for the observed Rb^+ permeability as deduced from differences in pharmacological pattern [24].

1.3. What Is the Pathway for Cations in Cells Expressing Point Mutated AE1? Point mutations in AE1 are associated with monovalent cation leak in red cells as in heterologous expression systems. This monovalent cation leak could be correlated to a non selective cation conductance and to elevated activity of endogenous transport systems.

Two possibilities that are not exclusive could be envisioned: the missense mutations in AE1 polypeptide change the transport properties of the protein that becomes leaky to Na^+ and K^+ , or the mutated AE1 stimulates native transporters for Na^+ and K^+ in red cells as in heterologous expression systems.

The work on trout AE1 has shown that this protein could interact with $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter by its carboxy terminal domain, stimulating the activity of this transporter in xenopus oocytes [39]. Reports on E758K and R730C AE1 mutations suggest that the cation leak associated with these mutations likely involves activation of still undefined endogenous transporters.

As AE1 forms part of a macrocomplex it functionally interacts with carbonic anhydrase [27, 40] and it is also involved in many molecular interactions in red cells, with ankyrin, glycophorin A (GPA), glycolytic enzymes or haemoglobin for instance [28, 41–43]. It is thus plausible that point mutated AE1 could interfere with different endogenous transporters (understood as pumps, channels or carriers) in red cells as in heterologous expression systems. It could be proposed that point mutations by changing AE1 conformation enable molecular interactions regulating the activity of various endogenous transporters. An AE1 mutated conformation could be envisioned which would not dramatically change AE1 transport features but would activate endogenous monovalent cation permeabilities in red cells as in heterologous expression systems. That should happen with different point mutations in AE1 membrane spanning domain.

Since pioneer work of electrophysiologists on red cells in the 80s [44], numerous cation and anion conductances have been characterized. Anion conductances (maxi-anion channels [45, 46]) or cation conductances such as non-selective Ca^{2+} permeable cation channels (L-type Ca^{2+} channel, voltage-dependent) or non-selective voltage-independent cation channels (NSVCC) [47–51] and Ca^{2+} sensitive K^+ channel (Gardos channel) [44] are well characterized in human red cells. It has been proposed that the TRPC6, member of

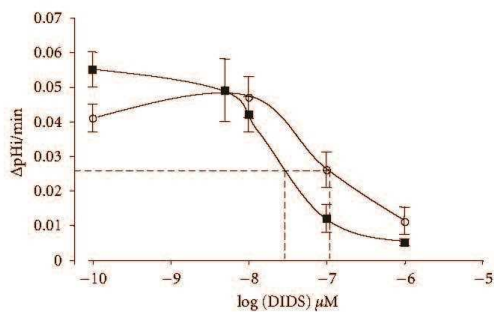


FIGURE 2: Dose response curves of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by DIDS. The capacity of oocytes expressing wt AE1 or R760Q mutant (10 ng cRNA co-injected with 2.5 ng GPA-cRNA in both cases) to alkalinize in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ buffer without extracellular Cl^- (gluconate medium) was assessed in presence of different DIDS concentrations. The initial slope of alkalinization as a function of time was plotted against DIDS concentrations. The method used was described in a previous publication [25]. Data are means \pm s.e.m. of 9 to 20 oocytes from different batches. Black symbols correspond to wt AE1 expressing oocytes, empty circles to R760Q mutant expressing oocytes.

mutation prevents DIDS covalent binding to the exchanger [20]. For the two mutants keeping anion exchange activity, the DIDS sensitivity of the transport is also impaired. Figure 2 illustrates $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange as a function of DIDS concentrations for R760Q mutant compared to wt AE1. The R760Q mutation decreases AE1 DIDS sensitivity as shown by the right shift of the dose-response curve. The anion uptake mediated by E758K mutant is also less sensitive to DIDS than wtAE1 [24].

Pharmacology of the cation leak induced by AE1 point mutations has also been investigated. Inhibition of the Na^+ and K^+ leak induced by L687P, D705Y, S731P, H734R and R760Q mutations has been observed in red cells with SITS, dipyrindamole and NS1652 also known to block anion exchanger [20]. Pharmacology of the cation leak is difficult to assess in xenopus oocytes since endogenous cation permeabilities could be activated by common AE1 inhibitors such as DIDS or niflumic acid [37, 38]. However, inhibition of the Na^+ and K^+ conductance induced by expression of mutated AE1 was observed with SITS and plurivalent cations such as Zn^{2+} , La^{3+} and Gd^{3+} [24, 25].

Amongst AE1 point mutations associated with cation leaky red cells, two mutants (R730C and E758K) exhibit peculiar transport features in amphibian oocytes. R730C AE1 mutant induces only a weak ouabain and bumetanide resistant cation leak in xenopus oocytes. It is not possible to measure a significant increase in ouabain and bumetanide-resistant $^{86}\text{Rb}^+$ uptake and only a ≈ 2.5 fold increase in Li^+ uptake is observed (to compare to ≈ 8 fold increase in oocytes expressing S731P mutant for instance). Moreover expression of R730C mutant is associated with an increased activity of the Na^+/K^+ ATPase [23]. For E758K mutant permeability features depend on the expression system. It has

been studied in two different amphibian oocytes, xenopus and ambystoma. In both species, its abundance in plasma membrane is dependent on the coexpression of GPA. The mutant keeps anion exchange activity and induces a $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in both systems. However, it appears that this Rb permeability is not correlated to the expression level of the mutant when expressed in ambystoma: the higher number of transporters when coexpressed with GPA does not induce a higher ^{86}Rb uptake. The expression of E758K mutant also slightly increases xenopus oocyte conductance but this conductance does not account for the observed Rb^+ permeability as deduced from differences in pharmacological pattern [24].

1.3. What Is the Pathway for Cations in Cells Expressing Point Mutated AE1? Point mutations in AE1 are associated with monovalent cation leak in red cells as in heterologous expression systems. This monovalent cation leak could be correlated to a non selective cation conductance and to elevated activity of endogenous transport systems.

Two possibilities that are not exclusive could be envisioned: the missense mutations in AE1 polypeptide change the transport properties of the protein that becomes leaky to Na^+ and K^+ , or the mutated AE1 stimulates native transporters for Na^+ and K^+ in red cells as in heterologous expression systems.

The work on trout AE1 has shown that this protein could interact with $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter by its carboxy terminal domain, stimulating the activity of this transporter in xenopus oocytes [39]. Reports on E758K and R730C AE1 mutations suggest that the cation leak associated with these mutations likely involves activation of still undefined endogenous transporters.

As AE1 forms part of a macrocomplex it functionally interacts with carbonic anhydrase [27, 40] and it is also involved in many molecular interactions in red cells, with ankyrin, glycophorin A (GPA), glycolytic enzymes or haemoglobin for instance [28, 41–43]. It is thus plausible that point mutated AE1 could interfere with different endogenous transporters (understood as pumps, channels or carriers) in red cells as in heterologous expression systems. It could be proposed that point mutations by changing AE1 conformation enable molecular interactions regulating the activity of various endogenous transporters. An AE1 mutated conformation could be envisioned which would not dramatically change AE1 transport features but would activate endogenous monovalent cation permeabilities in red cells as in heterologous expression systems. That should happen with different point mutations in AE1 membrane spanning domain.

Since pioneer work of electrophysiologists on red cells in the 80s [44], numerous cation and anion conductances have been characterized. Anion conductances (maxi-anion channels [45, 46]) or cation conductances such as non-selective Ca^{2+} permeable cation channels (L-type Ca^{2+} channel, voltage-dependent) or non-selective voltage-independent cation channels (NSVCC) [47–51] and Ca^{2+} sensitive K^+ channel (Gardos channel) [44] are well characterized in human red cells. It has been proposed that the TRPC6, member of

the Transient Receptor Potential family proteins, contributes to the non-selective voltage-independent cation current in red cells [52]. However, the molecular identity of channels responsible for most of the electrophysiologically described conductances is unknown. It could be proposed that the non selective Na^+ and K^+ leak induced by AE1 point mutations could be mediated by one of these conductances. However, the features of the cation leak associated with AE1 point mutations do not point out any of the red cell channels described so far. In particular, this cation leak is insensitive to amiloride known to block the NSVCC; it is insensitive to extracellular Cl^- concentration, known to stimulate red cell cation channels and it is insensitive to extracellular Ca^{2+} concentration [25]. Thus, in red cells as in heterologous expression system, the molecular identity of the transporters eventually activated by point mutated AE1 still remains unknown as their activating mechanism.

Whatever the origin of the cation leak induced by AE1 point mutations, the consecutive alteration of cation permeability will impair red cell homeostasis and modulate the activity of different transporters. The permeability features of red cells with H734R, G796R or R730C AE1 mutations show that the activity of different transporters could be stimulated: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter, Na^+ / K^+ ATPase, $\text{Na}^+ (\text{K}^+) / \text{H}^+$ exchanger and $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransporter [22, 23, 26]. This could be due to functional interactions between the AE1 point mutation induced cation leak and the mentioned transporters. As a consequence, a same AE1 mutation could lead to diverse phenotypes in red cells depending on how the endogenous transporters react to the initial cation leak.

In the absence of identified native transporter mediating the cation leak associated with AE1 point mutations, the hypothesis of a cation leaky AE1 is challenging and the simplest to propose. Moreover, it provides an attractive approach to understand the transport mechanism of this protein. Whereas it is depicted as a typical electroneutral anion exchanger, the anion exchange rate through AE1 is extremely fast (10 000 per second) and Cl^- slippage occurs occasionally (1 for 10 000 exchange). Crystallographic structures are not available yet with enough resolution to help understand the transport mechanism [53]. This mechanism should allow very rapid conformational changes that could resemble alternately opened gates for instance. Previous work on trout AE1 has shown that this exchanger can behave as an anion conductance permeable to organic solutes (taurine, sorbitol) and to monovalent cations (Na^+ and K^+) [54, 55]. The work on a truncated human AE1 has also shown that this protein could behave like a conductance when it was deleted of transmembrane segments 6 and 7 [56]. Thus, it appears feasible to convert the electroneutral anion exchanger into a conductive pathway by different manoeuvres. Former studies in red cells, based on pharmacological evidence, have also suggested that a monovalent cation leak through AE1 could be induced by decreasing extracellular Cl^- concentration [57]. The speculations about a monovalent cation leak through AE1 polypeptide have to combine the following considerations.

The point mutations induce a conformational change of the protein as suggested by changes in pharmacology

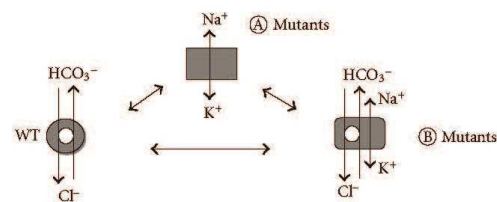


FIGURE 3: Putative transport states of AE1. Whereas the wt AE1 does only exchange Cl^- and HCO_3^- , a A mutated state only conducts monovalent cations and a B mutated state shows both transport activities, anion exchange and cation leak. The A state should be obtained with L687B, D705Y, R730C, S731P, H734R, S762R and G796R mutations. The B state should be obtained with E758K and R760Q mutations.

sensitivity (Figure 2), by impairment of anion exchange capacity or by requirement of GPA for correct addressing to plasma membrane. Moreover, diverse point mutations are likely to produce a similar AE1 conformation as deduced from similar permeability patterns. The transport features of cells expressing AE1 suggest at least three functional states for AE1: the wt state, a A mutated state where no anion exchange occurs only cation leak exists and a B mutated state where anion exchange and cation leak coexist (Figure 3). Whether or not these functional states are linked to different structural states of AE1 has to be shown but it is likely.

It appears that apparent unrelated positions in AE1 membrane spanning domain are susceptible to impair anion exchange function in the same way: point mutations L687B, D705Y, S731P, H734R, S762R and G796R abolish anion exchange and induce a similar monovalent cation leak that is also similar to the cation leak observed in cells expressing the mutated AE1 responsible for South East Asian Ovocytosis (SAO AE1) [21]. SAO AE1 is deleted of 9 amino acids at the junction of cytoplasmic domain and membrane spanning domain of the protein [58]. This mutation is prevalent in South East Asian population where it is proposed to protect against severe forms of malaria [59]. Thus, the cation leaky conformation appears as a complex organization involving distant segments in the membrane spanning domain of the protein and this conformation could be obtained either by a deletion at the junction of cytoplasmic and transmembrane domain (SAO AE1) or by some specific point mutations. The cytoplasmic domain, *per se*, is probably not involved in the cation leaky conformation as suggested by the work on a trout AE1 deleted of cytoplasmic domain that kept its conductive transport mechanism [60].

In wtAE1, the anion exchange site involves transmembrane helix 8 (TM 8) and an anion selectivity filter including a region at the top of TM 12 and 13 and amino acids in the loop connecting TM 7 and 8 [61, 62]. Our recent work on the cation leaky H734R mutant has shown that the same TM 8 was also involved in cation movement suggesting a common pathway for anions and cations through AE1 [63]. Moreover, it was shown that amino acids in the intracellular loop connecting TM 8 and TM 9 play an important role in AE1

transport features. For instance, substitution of the charged residues in this loop induces a cation leak and severely impairs anion exchange activity. The position of the point mutations S731P, H734R, E758K, R760Q and S762R at both extremities of the next loop connecting TM 9 and 10, also suggests an important functional role for this central part of the membrane spanning domain. Amino acid substitutions in these two loops could change the orientation, rotation or movements of TM 8, 9 and 10 and impair AE1 transport site. The leak could be seen as a broken seal in the transport system that leaks Na^+ and K^+ for which a high driving force exists. This leads to consider that the transport site is susceptible to structural changes that could be induced by diverse but specific amino acid substitutions. This change unmasks a conductance for monovalent cations that does not seem to interfere with the ability to exchange anions since some mutants exhibit both transport activities.

The possibility for a carrier to function as a channel seems conflicting. Indeed channels are seen as structures that could simultaneously connect intra and extracellular medium, what should never happen through a carrier. However, there are increasing examples of membrane proteins with ambiguous behaviour between channels and transporters. A historical example of transporter with channel activity is the glutamate transporter which is also a chloride channel [64–66]. Chloride channels, Na^+ - K^+ pump are other examples of ambiguous transport mechanisms between channels and transporters which strengthen our simple hypothesis of cation leaky AE1 [65–69]. In red cells, monovalent cation leak has also been associated with heterozygous mutations on RhAG (Rhesus Associated Glycoprotein) gene. Two different amino acid substitutions in RhAG could turn on a cation pore through this membrane protein proposed to be a $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ transporter in red cells [70].

2. Conclusion

Whereas specific AE1 mutations are undoubtedly linked to cation leaky red cells responsible for hereditary haemolytic anaemia, it is observed that all the 9 AE1 mutations presented here do not impair AE1 transport features in a similar manner. Moreover, membrane permeability of cells expressing point mutated AE1 shows some differences suggesting a complicated regulation of this permeability. The proposition of point mutations altering AE1 transport mechanism is an attractive hypothesis supported by experimental evidence. However, this does not exclude the possibility for some mutated AE1 to also regulate the activity of other transporters.

Resolution of the 3D structure of AE1 would greatly help to understand the peculiar transport properties of this surprising protein. It would be of particular interest to know how the studied AE1 point mutations alter AE1 structure, if these different point mutations have a common mechanism of action on the structure. A better understanding of the mechanistic of interactions between AE1 and its partners would also help to assign new regulatory function to AE1.

References

- [1] S. L. Alper, "Molecular physiology of SLC4 anion exchangers," *Experimental Physiology*, vol. 91, no. 1, pp. 153–161, 2006.
- [2] A. Pushkin and I. Kurtz, "SLC4 base (HCO_3^- , CO_3^{2-}) transporters: classification, function, structure, genetic diseases, and knockout models," *American Journal of Physiology*, vol. 290, no. 3, pp. F580–F599, 2006.
- [3] M. F. Romero, "Molecular pathophysiology of SLC4 bicarbonate transporters," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 14, no. 5, pp. 495–501, 2005.
- [4] N. Hamasaki and K. Okubo, "Band 3 protein: physiology, function and structure," *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, vol. 42, no. 7, pp. 1025–1039, 1996.
- [5] M. Puc  at, I. Korichneva, R. Cassoly, and G. Vassort, "Identification of band 3-like proteins and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in isolated cardiomyocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 3, pp. 1315–1322, 1995.
- [6] H. H  gerstrand, M. X. Danieluk, M. X. Bobrowska-H  gerstrand et al., "Influence of band 3 protein absence and skeletal structures on amphiphile- and Ca^{2+} -induced shape alterations in erythrocytes: a study with lamprey (*Lampetra fluviatilis*), trout (*Onchorhynchus mykiss*) and human erythrocytes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1466, no. 1–2, pp. 125–138, 2000.
- [7] C. D. Southgate, A. H. Chishti, B. Mitchell, S. J. Yi, and J. Palek, "Targeted disruption of the murine erythroid band 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton," *Nature Genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 227–230, 1996.
- [8] M. L. Ribeiro, N. Alloisio, H. Almeida et al., "Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3," *Blood*, vol. 96, no. 4, pp. 1602–1604, 2000.
- [9] M. Inaba, A. Yawata, I. Koshino et al., "Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 8, pp. 1804–1817, 1996.
- [10] B. H. Paw, A. J. Davidson, Y. Zhou et al., "Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency," *Nature Genetics*, vol. 34, no. 1, pp. 59–64, 2003.
- [11] P. Jarolim, "Disorders of band 3," in *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, J. C. Ellory and I. Bernhardt, Eds., pp. 603–619, Springer, Berlin, Germany, 2003.
- [12] S. L. Alper, "Diseases of mutations in the SLC4A1/AE1 polypeptide," in *Membrane Transport Diseases*, S. Broer and C. Wagner, Eds., pp. 39–63, Kluwer Academic, Boston, Mass, USA, 2003.
- [13] S. L. Alper, "Familial renal tubular acidosis," *Journal of Nephrology*, vol. 23, supplement 16, pp. S57–S76, 2010.
- [14] L. J. Bruce and M. J. A. Tanner, "Erythroid band 3 variants and disease," *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Haematology*, vol. 12, no. 4, pp. 637–654, 1999.
- [15] A. M. Toye, "Defective kidney anion-exchanger I (AE1, Band 3) trafficking in dominant distal renal tubular acidosis (dRTA)," *Biochemical Society Symposium*, vol. 72, pp. 47–63, 2005.
- [16] A. Iolascon, E. M. Del Giudice, S. Perrotta, N. Alloisio, L. Mor  , and J. Delaunay, "Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects," *Haematologica*, vol. 83, no. 3, pp. 240–257, 1998.
- [17] P. Jarolim, J. L. Murray, H. L. Rubin et al., "Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency," *Blood*, vol. 88, no. 11, pp. 4366–4374, 1996.

- [18] J. F. Flatt and L. J. Bruce, "The hereditary stomatocytoses," *Haematologica*, vol. 94, no. 8, pp. 1039–1041, 2009.
- [19] G. W. Stewart, "Hemolytic disease due to membrane ion channel disorders," *Current Opinion in Hematology*, vol. 11, no. 4, pp. 244–250, 2004.
- [20] L. J. Bruce, H. C. Robinson, H. Guizouarn et al., "Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1," *Nature Genetics*, vol. 37, no. 11, pp. 1258–1263, 2005.
- [21] H. Guizouarn, F. Borgese, N. Gabillat et al., "South-east Asian ovalocytosis and the cryohydrocytosis form of hereditary stomatocytosis show virtually indistinguishable cation permeability defects," *British Journal of Haematology*, vol. 152, no. 5, pp. 655–664, 2011.
- [22] A. Iolascon, L. De Falco, F. Borgese et al., "A novel erythroid anion exchange variant (Gly796Arg) of hereditary stomatocytosis associated with dyserythropoiesis," *Haematologica*, vol. 94, no. 8, pp. 1049–1059, 2009.
- [23] A. K. Stewart, P. S. Kedar, B. E. Shmukler et al., "Functional characterization and modified rescue of novel AE1 mutation R730C associated with overhydrated cation leak stomatocytosis," *American Journal of Physiology*, vol. 300, no. 5, pp. C1034–C1046, 2011.
- [24] A. K. Stewart, D. H. Vandrope, J. F. Heneghan et al., "The GPA-dependent, spherostomatocytosis mutant AE1 E758K induces GPA-independent, endogenous cation transport in amphibian oocytes," *American Journal of Physiology*, vol. 298, no. 2, pp. C283–C297, 2010.
- [25] H. Guizouarn, S. Martial, N. Gabillat, and F. Borgese, "Point mutations involved in red cell stomatocytosis convert the electroneutral anion exchanger 1 to a nonselective cation conductance," *Blood*, vol. 110, no. 6, pp. 2158–2165, 2007.
- [26] A. Bogdanova, J. S. Goede, E. Weiss et al., "Cryohydrocytosis: increased activity of cation carriers in red cells from a patient with a band 3 mutation," *Haematologica*, vol. 95, no. 2, pp. 189–198, 2010.
- [27] P. E. Morgan, S. Pastoreková, A. K. Stuart-Tilley, S. L. Alper, and J. R. Casey, "Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters," *American Journal of Physiology*, vol. 293, no. 2, pp. C738–C748, 2007.
- [28] L. J. Bruce, R. Beckmann, M. L. Ribeiro et al., "A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane," *Blood*, vol. 101, no. 10, pp. 4180–4188, 2003.
- [29] Q. Zhu, D. W. K. Lee, and J. R. Casey, "Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 5, pp. 3112–3120, 2003.
- [30] J. Delaunay, "The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations," *Seminars in Hematology*, vol. 41, no. 2, pp. 165–172, 2004.
- [31] J. C. Ellory, H. Guizouarn, F. Borgese, L. J. Bruce, R. J. Wilkins, and G. W. Stewart, "Leaky Cl–HCO₃– exchangers: cation fluxes via modified AE1," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 364, no. 1514, pp. 189–194, 2009.
- [32] J. D. Groves and M. J. A. Tanner, "Glycophorin A facilitates the expression of human band 3-mediated anion transport in *Xenopus* oocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 31, pp. 22163–22170, 1992.
- [33] R. C. Williamson and A. M. Toye, "Glycophorin A: band 3 aid," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 41, no. 1, pp. 35–43, 2008.
- [34] M. T. Young and M. J. A. Tanner, "Distinct regions of human glycophorin A enhance human red cell anion exchanger (band 3; AE1) transport function and surface trafficking," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 35, pp. 32954–32961, 2003.
- [35] M. J. Jennings and H. Passow, "Anion transport across the erythrocyte membrane, in situ proteolysis of band 3 protein, and cross-linking of proteolytic fragments by 4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonate," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 554, no. 2, pp. 498–519, 1979.
- [36] K. Okubo, D. Kang, N. Hamasaki, and M. L. Jennings, "Red blood cell band 3. Lysine 539 and lysine 851 react with the same H2DIDS (4,4'-diisothiocyanodihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid) molecule," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 3, pp. 1918–1926, 1994.
- [37] A. Bielfeld-Ackermann, C. Range, and C. Korbmayer, "Maitotoxin (MTX) activates a nonselective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 436, no. 3, pp. 329–337, 1998.
- [38] A. Diakov, J. P. Koch, O. Ducoudret, S. Müller-Berger, and E. Frömter, "The disulfonic stilbene DIDS and the marine poison maitotoxin activate the same two types of endogenous cation conductance in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes," *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 442, no. 5, pp. 700–708, 2001.
- [39] H. Guizouarn, N. Gabillat, and F. Borgese, "Evidence for Up-regulation of the Endogenous Na-K-2Cl Co-transporter by Molecular Interactions with the Anion Exchanger tAE1 Expressed in *Xenopus* Oocyte," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 12, pp. 11513–11520, 2004.
- [40] D. Sterling, R. A. F. Reithmeier, and J. R. Casey, "A transport metabolon: functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 51, pp. 47886–47894, 2001.
- [41] M. E. Campanella, H. Chu, N. J. Wandersee et al., "Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice," *Blood*, vol. 112, no. 9, pp. 3900–3906, 2008.
- [42] H. Chu and P. S. Low, "Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3," *Biochemical Journal*, vol. 400, no. 1, pp. 143–151, 2006.
- [43] G. Chérite and R. Cassoly, "Affinity of hemoglobin for the cytoplasmic fragment of human erythrocyte membrane band 3. Equilibrium measurements at physiological pH using matrix-bound proteins: the effects of ionic strength, deoxygenation and of 2,3-diphosphoglycerate," *Journal of Molecular Biology*, vol. 185, no. 3, pp. 639–644, 1985.
- [44] R. Grygorczyk and W. Schwarz, "Properties of the Ca²⁺-activated K⁺ conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique," *Cell Calcium*, vol. 4, no. 5-6, pp. 499–510, 1983.
- [45] G. Decherf, G. Bouyer, S. Egée, and S. L. Y. Thomas, "Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 39, no. 1, pp. 24–34, 2007.
- [46] E. Glogowska, A. Dyrda, A. Cuffe et al., "Anion conductance of the human red cell is carried by a maxi-anion channel," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 44, no. 4, pp. 243–251, 2010.
- [47] P. Bennekou, T. L. Barksmann, B. I. Kristensen, L. R. Jensen, and P. Christophersen, "Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 33, no. 3, pp. 356–361, 2004.

- [48] P. Bennekou, T. L. Barksman, L. R. Jensen, B. I. Kristensen, and P. Christophersen, "Voltage activation and hysteresis of the non-selective voltage-dependent channel in the intact human red cell," *Bioelectrochemistry*, vol. 62, no. 2, pp. 181–185, 2004.
- [49] P. Christophersen and P. Bennekou, "Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1065, no. 1, pp. 103–106, 1991.
- [50] L. Kaestner and I. Bernhardt, "Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance," *Bioelectrochemistry*, vol. 55, no. 1–2, pp. 71–74, 2002.
- [51] L. Kaestner, P. Christophersen, I. Bernhardt, and P. Bennekou, "The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation," *Bioelectrochemistry*, vol. 52, no. 2, pp. 117–125, 2000.
- [52] M. Föller, R. S. Kasinathan, S. Koka et al., "TRPC6 contributes to the Ca^{2+} leak of human erythrocytes," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 21, no. 1–3, pp. 183–192, 2008.
- [53] T. Yamaguchi, T. Fujii, Y. Abe et al., "Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals," *Journal of Structural Biology*, vol. 169, no. 3, pp. 406–412, 2010.
- [54] H. Guizouarn, N. Gabillat, R. Motais, and F. Borgese, "Multiple transport functions of a red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation," *Journal of Physiology*, vol. 535, no. 2, pp. 497–506, 2001.
- [55] S. Martial, H. Guizouarn, N. Gabillat, B. Pellissier, and F. Borgese, "Consequences of point mutations in trout anion exchanger 1 (tAE1) transmembrane domains: evidence that tAE1 can behave as a chloride channel," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 207, no. 3, pp. 829–835, 2006.
- [56] M. D. Parker, M. T. Young, C. M. Daly, R. W. Meech, W. F. Boron, and M. J. A. Tanner, "A conductive pathway generated from fragments of the human red cell anion exchanger AE1," *Journal of Physiology*, vol. 581, no. 1, pp. 33–50, 2007.
- [57] G. S. Jones and P. A. Knauf, "Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media," *Journal of General Physiology*, vol. 86, no. 5, pp. 721–738, 1985.
- [58] P. Jarolim, J. Palek, D. Amato et al., "Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 24, pp. 11022–11026, 1991.
- [59] S. J. Allen, A. O'Donnell, N. D. E. Alexander et al., "Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by Southeast Asian ovalocytosis band 3," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 60, no. 6, pp. 1056–1060, 1999.
- [60] B. Fiévet, N. Gabillat, F. Borgese, and R. Motais, "Expression of band 3 anion exchanger induces chloride current and taurine transport: structure-function analysis," *The EMBO Journal*, vol. 14, no. 21, pp. 5158–5169, 1995.
- [61] X. B. Tang, M. Kovacs, D. Sterling, and J. R. Casey, "Identification of residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 6, pp. 3557–3564, 1999.
- [62] Q. Zhu and J. R. Casey, "The substrate anion selectivity filter in the human erythrocyte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange protein, AE1," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 22, pp. 23565–23573, 2004.
- [63] D. Barneaud-Rocca, F. Borgese, and H. Guizouarn, "Dual transport properties of anion exchanger 1: the same transmembrane segment is involved in anion exchange and in a cation leak," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 11, pp. 8909–8916, 2011.
- [64] H. P. Larsson, S. A. Picaud, F. S. Werblin, and H. Lecar, "Noise analysis of the glutamate-activated current in photoreceptors," *Biophysical Journal*, vol. 70, no. 2, pp. 733–742, 1996.
- [65] R. M. Ryan and R. J. Vandenberg, "A channel in a transporter," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–6, 2005.
- [66] R. J. Vandenberg, S. Huang, and R. M. Ryan, "Slips, leaks and channels in glutamate transporters," *Channels*, vol. 2, no. 1, pp. 51–58, 2008.
- [67] L. J. DeFelice and T. Goswami, "Transporters as channels," *Annual Review of Physiology*, vol. 69, pp. 87–112, 2007.
- [68] C. Miller, "ClC chloride channels viewed through a transporter lens," *Nature*, vol. 440, no. 7083, pp. 484–489, 2006.
- [69] A. Takeuchi, N. Reyes, P. Artigas, and D. C. Gadsby, "The ion pathway through the opened Na^+, K^+ -ATPase pump," *Nature*, vol. 456, no. 7220, pp. 413–416, 2008.
- [70] L. J. Bruce, H. Guizouarn, N. M. Burton et al., "The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein," *Blood*, vol. 113, no. 6, pp. 1350–1357, 2009.

7.4.3 Article 3 : Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segment forming the transport site

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 288, NO. 37, PP. 26372–26384, SEPTEMBER 13, 2013
© 2013 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PUBLISHED IN THE U.S.A.

Structural Model of the Anion Exchanger 1 (SLC4A1) and Identification of Transmembrane Segments Forming the Transport Site^S

Received for publication, March 5, 2013, and in revised form, July 10, 2013. Published, JBC Papers in Press, July 11, 2013, DOI:10.1074/jbc.M113.465989

Damien Barneaud-Rocca^{‡§¶}, Catherine Etchebest^{||*†§§}, and Hélène Guizouarn^{‡§¶1}

From the [‡]Université Nice Sophia Antipolis, Institut de Biologie Valrose, UMR7277, 06100 Nice, France, [§]CNRS, UMR7277, 06100 Nice, France, [¶]INSERM U1091, 06100 Nice, France, ^{||}Dynamique des Structures et des Interactions des Macromolécules Biologiques, INSERM, U665, F-75015 Paris, France, ^{*}Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR_S665, F-75015 Paris, France, ^{††}Institut National de la Transfusion Sanguine, F-75015 Paris, France, and ^{§§}Laboratoire d'Excellence GR-Ex, 6 rue Alexandre Cabanel, 75739 Paris Cedex, France

Background: There is still no high resolution three-dimensional structure available for the membrane-spanning domain of anion exchanger 1 (AE1).

Results: A three-dimensional model of AE1 membrane-spanning domain has been generated *in silico* and experimentally assessed.

Conclusion: Transmembrane segments forming AE1 transport site have been identified.

Significance: This is the first three-dimensional model of AE1 membrane-spanning domain based on a cation symporter.

The anion exchanger 1 (AE1), a member of bicarbonate transporter family SLC4, mediates an electroneutral chloride/bicarbonate exchange in physiological conditions. However, some point mutations in AE1 membrane-spanning domain convert the electroneutral anion exchanger into a Na⁺ and K⁺ conductance or induce a cation leak in a still functional anion exchanger. The molecular determinants that govern ion movement through this transporter are still unknown. The present study was intended to identify the ion translocation pathway within AE1. In the absence of a resolutive three-dimensional structure of AE1 membrane-spanning domain, *in silico* modeling combined with site-directed mutagenesis experiments was done. A structural model of AE1 membrane-spanning domain is proposed, and this model is based on the structure of a uracil-proton symporter. This model was used to design cysteine-scanning mutagenesis on transmembrane (TM) segments 3 and 5. By measuring AE1 anion exchange activity or cation leak, it is proposed that there is a unique transport site comprising TM3–5 and TM8 that should function as an anion exchanger and a cation leak.

The anion exchanger 1 (AE1,² SLC4A1, or band 3) is the main membrane protein in vertebrate red cells. It fulfills different tasks in these cells: a structural role by linking plasma membrane to cytoskeleton, a respiratory role by improving CO₂

transport capacity of red cells, and an antigenic function (Diego blood group and senescence), and it is also involved in cytokinesis and red cell volume regulation (1). At the molecular level, this protein is divided into two main structural domains: a cytoplasmic N-terminal domain (about 400 amino acids) and a membrane-spanning domain (about 450 amino acids) with a short C-terminal tail in the cytoplasm. These two entities seem to function independently: the large cytoplasmic domain is involved in interactions with enzymes, hemoglobin, and structural proteins, whereas the membrane-spanning domain is responsible for the transport activity of the protein (2, 3). In addition to red cells, AE1 is also expressed in kidney α -intercalated cells and cardiac myocytes (4). In physiological conditions, AE1 exchanges one chloride for one bicarbonate by an electroneutral transport mechanism with the driving force for ion movement provided by their electrochemical gradient. A few years ago, some specific point mutations were characterized and proposed to convert the electroneutral anion exchanger into a cation-conductive pathway (5, 6). These mutations are associated with human pathologies (hereditary hemolytic anemia and distal renal tubular acidosis) (7–10). In addition to naturally occurring mutations identified in patients with hereditary stomatocytosis or distal renal tubular acidosis, a sequence-function analysis of AE1 revealed other amino acids crucial for transport properties of the protein (11). Unexpected transport activity of AE1 had already been suggested in the past: Tanner and co-workers (12) had shown that human AE1 could behave as a conductive pathway when two putative membrane-spanning helices in the membrane domain of the protein were removed. These data supported the work of Motais and co-workers (13–16) who showed that trout AE1 forms an anion conductive pathway permeable to organic (taurine and choline) and inorganic (Na⁺ and K⁺) ions in response to decreased ionic strength in red cells. Moreover, AE1 is also able to mediate a proton-anion cotransport when protonated (17, 18).

^S This article contains supplemental Figs. 1–6 and Tables 1 and 2.

¹ To whom correspondence should be addressed: Inst. de Biologie de Valrose, Bâtiment de Sciences Naturelles, 28 av. Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France. E-mail: helene.guizouarn@unice.fr.

² The abbreviations used are: AE, anion exchanger; TM, transmembrane; hAE1, human AE1; MBS, modified Barth's saline; PCMB, *para*-chloromercuribenzenesulfonate; MTSEA, 2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide; MTSET, 2-(trimethylammonium)ethyl methanethiosulfonate bromide; MTSES, 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate; DIDS, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate; NI, non-injected; g d.w., g of dry weight.

Thus, transport features of AE1 seem to be flexible in response to different stimuli such as mutations (point mutations or deletions), intracellular ionic strength, and pH. The identification of AE1 as a key actor in some types of hereditary stomatocytosis associated with cation-leaky red cells reinforces the interest in understanding the transport process through AE1 protein. Although the three-dimensional structure of AE1 cytoplasmic domain has been solved, the three-dimensional structure of the membrane-spanning domain is not yet available with a resolution high enough to determine the helical packing of the entire membrane domain or to provide insights into the transport mechanism at the molecular level. Thus, our present understanding of ion transport is mainly based on biochemical and functional studies. In an attempt to define the AE1 transport site, cysteine-scanning mutagenesis has been used, and it was shown that the eighth putative helix (TM8) in AE1 membrane-spanning domain lined the anion exchange site (19). Moreover, it has been proposed that this putative TM8 was also involved in the cation leak induced by specific point mutations in AE1 (11). These data point to a unique transport site in the AE1 membrane domain. Its transport mechanism and selectivity could then be modified by specific point mutations.

To further understand the topology and the structure of the AE1 transport site, we combined *in silico* protein modeling and site-directed mutagenesis. A three-dimensional model of AE1 membrane-spanning domain was generated, and its reliability was assessed by experimental and bibliographical data mining.

The present data show that putative TM3, TM5, and TM8 form a central core strongly involved in AE1 transport activity. Cysteine-scanning mutagenesis in these helices allowed identification of residues lining the anion exchange pathway in WT AE1. Moreover, working with a point-mutated AE1 (H734R) in which the anion exchange was converted into a cation leak, it was shown that the same domain was also involved in cation transport. Some key amino acids in TM5 control anion exchange activity of the protein: their substitution abolished anion exchange activity and/or induced a Na⁺ and K⁺ leak. This study proposes a spatial organization of the membrane-spanning domain and identifies three helices involved in the formation of the transport site. Moreover, this study confirms that this transport site is able to function as an anion exchange and/or a cation leak.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Three-dimensional Structure Prediction and Modeling—The structural modeling of the AE1 human sequence (UniProt accession number P02730) was restricted to the C-terminal sequence, starting from positions 399 to 911. This region encompasses the transmembrane domain. A search for homologous sequences in the Protein Data Bank with BLAST or PSI-BLAST did not retrieve any result except for the cytoplasmic loop (positions 804–835; Protein Data Bank code 1BH7) and the first and second transmembrane spans (positions 399–431 (Protein Data Bank 1BZK) and positions 437–457, respectively) that were solved by NMR. Hence, we resorted to using the I-TASSER method (web service version) that combines a threading approach with fragment prediction. We looked for

structural templates with or without imposing constraints. We also tested alternative tools separately such as the HHPred web server, SAM-T08 web server, and DELTA-BLAST tool (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) recently implemented on the NCBI web site. In the case of I-TASSER, the three first models showed very close C-scores (−2.24, −2.24, and −2.28, respectively) and similar cluster densities. Among the top 10 templates with a significant overlap (>70%) were the glucose symporter (Protein Data Bank code 3DH4) and the uracil transporter (Protein Data Bank code 3QE7). The other prediction tools only retrieved the latter, *i.e.* Protein Data Bank code 3QE7. Despite a rather low identity score (<20%), the E-value and *p* value provided by the HHPred tool encouraged us to proceed with the corresponding template. This template is mainly used in model 3 of I-TASSER.

We then performed a forward-backward approach that consisted of the following: 1) selecting a model in which residues were close enough to be consistent with experimental data available (see “Results” and “Discussion”), 2) designing mutations that could interfere with the putative channel, and 3) refining the model if required. Refinement mainly consisted in rotating TM5 helix around the helical axis to account for proximities deduced from the impact of mutations established by *in vivo* experiments. Local distortions in helical backbone generated by the rotation were removed by imposing helical secondary structure constraints in TM5 and TM8 segments with Modeller software. The model was then relaxed with 1000 steps of steepest descent minimization using the Amber force field implemented in Chimera software (20). In the resulting three-dimensional structure, 92% of the residues are located in favorable or acceptable regions of the Ramachandran diagram. Note that we did not refine conformation of the loops as the presence of the membrane would be required.

Functional Expression of AE1—The experimental procedures are identical to those described in our previous work (11).

Construction of hAE1 cDNA with Point Mutations—The following mutations were constructed: S465C/I/A, L468C, F471C, E472C, E473C, and F475C in putative TM3 and S525C, F526C, I528C, S529C, L530C, F532C, I533C, Y534C, E535C, F537C, K539C, L540C, I541C, and K542C in putative TM5. Site-directed mutagenesis was performed on wild type human erythroid AE1 cloned in pSP65 using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with primers covering 15 bases upstream and downstream of the mutation (Eurogentec, Seraing, Belgium). One positive clone for each mutation was sequenced before further use (Beckman Cogenics, Takeley, UK). The plasmid with H734R point mutation in AE1 was described previously (11). It was used to introduce cysteine in TM5 or TM3, taking advantage of a unique restriction site (PstI) between TM3 or TM5 and the His⁷³⁴ position. The PstI-HindIII digestion of AE1 plasmids with cysteine in TM3 or TM5 was purified and ligated with the PstI-HindIII digestion of H734R mutant. Recombinant plasmids carrying the double mutation Cys in TM3 or TM5 and H734R were further sequenced to check constructions.

Oocyte Injection—Isolation and cRNA injection of oocytes were performed as described previously (13). Briefly, HindIII-linearized pSP65hAE1WT and mutant plasmids were tran-

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

scribed by SP6 RNA polymerase (Ambion transcription kit). Female *Xenopus laevis* were anesthetized with MS222 according to the procedure recommended by our ethics committee.

Stage V-VI oocytes were injected with 10 ng of AE1 (WT and mutated) cRNA. Injected oocytes were maintained at 18 °C in modified Barth's saline (MBS) for 3 or 4 days before running the experiments. MBS composition was as follows: 85 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 4.5 mM NaOH, pH 7.4 supplemented with 10 units/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin. For Na⁺ and K⁺ content measurements, oocytes were incubated in MBS with 0.5 mM ouabain and 5 µM bumetanide. Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity, Na⁺ and K⁺ contents, Li⁺ uptake, and biotin labeling of membrane proteins were determined on the same batch of oocytes 3 or 4 days after injection.

Thiol Alkylations—Thiol alkylation of cysteines was performed by oocyte incubation for 15 min at room temperature in MBS with 1 mM *para*-chloromercuribenzenesulfonate (PCMB; Sigma) or 5 mM 2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide (MTSEA) extemporaneously prepared from stock solutions (1 M in DMSO) stored at -20 °C. For 2-(trimethylammonium)ethyl methanethiosulfonate bromide (MTSET) and 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate (MTSES), they were weighed and solubilized in MBS at 5 mM just before use. (MTS reagents were from Toronto Research Chemicals, Canada). After 15 min, oocytes were washed in MBS and directly assessed for Li⁺ uptake experiments or pH_i measurements.

Oocyte Na⁺ and K⁺ Content Measurements—As published previously (13), oocytes incubated in MBS with ouabain and bumetanide were quickly washed two times in 7.5 ml of Milli-Q water (Millipore) and dried on aluminum foil overnight at 80 °C after removing excess extracellular fluid. Dried oocytes were weighted to determine dry cell solids. Intracellular ions were extracted by suspending dried oocytes in 4 ml of Milli-Q water overnight at 4 °C. Measurements of sodium and potassium were done with a flame spectrophotometer (Eppendorf). For each experiment, a triplicate was made for each condition, and results were expressed as micromoles/gram of dry cell solids.

Cl⁻/HCO₃⁻ Exchange Activity Measurements—Oocyte intracellular pH was measured using selective microelectrodes as published previously (5).

The ability of WT and mutant hAE1 to regulate intracellular pH was assessed by measuring the intracellular pH of oocytes acidified by incubation in medium (63.4 mM NaCl, 1 mM KCl, 24 mM HCO₃⁻, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.35, 5% CO₂, 95% O₂) and then bathed with MBS without Cl⁻ (63.4 mM sodium gluconate, 1 mM potassium gluconate, 24 mM HCO₃⁻, 0.82 mM MgSO₄, 0.74 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES/NaOH, pH 7.35, 5% CO₂, 95% O₂). Results are given in ΔpH_i/min ± S.E. ΔpH_i was measured when acidified oocytes were exposed to Cl⁻-free medium; it corresponds to the initial slope of the alkalization.

Li⁺ Uptake—Li⁺ was used as a substitute for Na⁺ to measure oocyte cation permeability. To prevent cation movements through the Na,K-ATPase or the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, Li⁺ uptake was done in presence of 5 µM bumetanide and 0.5 mM ouabain in LiNO₃ MBS (85 mM LiNO₃, 1 mM KNO₃, 2.4 mM

NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 4.5 mM NaOH, pH 7.4). In each experiment, nine oocytes per condition were incubated for 2 h in LiNO₃ MBS at 19 °C. Li⁺ was quantified in each individual oocyte by atomic absorption spectrometry with a PerkinElmer Life Sciences AAS3110 instrument. Results are expressed in pmol/oocyte·h (mean ± S.E. of nine oocytes per experimental condition).

AE1 Immunodetection on Oocyte Plasma Membrane—To detect AE1 addressed to the oocyte plasma membrane, surface proteins of oocytes expressing WT or mutated AE1 were labeled with sulfo-NHS-SS-biotin (sulfosuccinimidyl-2-[biotinamido]ethyl-1,3-dithiopropionate; Pierce) in MBS, pH 8 at 4 °C as described previously (11). After a 15-min incubation, the reaction was quenched with buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄), and oocytes were washed in MBS, pH 8. Oocytes were then lysed mechanically in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM protease inhibitor Pefabloc (Roche Applied Science)), and oocyte membranes were solubilized in radioimmune precipitation assay buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM Pefabloc) for 30 min at 4 °C. Biotin-labeled proteins in the solubilized membranes were isolated by immobilization on avidin resin (Pierce) for 30 min at 4 °C. After washing in radioimmune precipitation assay buffer, biotin-labeled proteins were eluted in SDS-PAGE loading buffer, analyzed by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane (Millipore), and probed with primary antibodies as indicated in the figure legends. Secondary antibodies were anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-coupled (Sigma) and detected by chemiluminescence reaction with Immobilon Western reagent (Millipore) and a Fusion FX7 imaging system (Vilber-Lourmat, France). To compare AE1 expression levels in different samples, the cell membrane marker β1 Na,K-ATPase was used. The intensity of each AE1 band relative to the total membrane fraction (β1 Na,K-ATPase signal) was quantified in each lane with NIH ImageJ software.

RESULTS

Model of AE1 Membrane-spanning Domain

Structural modeling of AE1 is problematic because of the absence of homologous structure available. Even the location of transmembrane segments is subject to controversy; the number and limits of transmembrane (TM) segments are dependent on the prediction tools used (see supplemental Table 1). The consensus is better in the N-terminal transmembrane domain from residue 398 to residue 728. In most cases, this domain encompasses eight transmembrane helices, but their length and precise location vary depending on the tool. The region from residue 730 to the end is much more variable with the number of helices ranging from 1 to 5. Similarly, prediction of inside/outside topology is also rather fuzzy. Altogether, these tools do not provide three-dimensional information (*i.e.* three-dimensional proximities of transmembrane segments) but help in considering alternative topologies. For predicting three-dimensional structures in the absence of clear homology, alternative

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

approaches are required. Therefore, we resorted to the I-TASSER method.

Among the five models proposed by I-TASSER, three of them were rather similar up to residue 850. These models are mostly based on the uracil transporter (Protein Data Bank code 3QE7). Model 2, based on the importin β subunit, was discarded because its topology was not compatible with most data available. Model 1 presented a topology based on the Na⁺-glucose symporter and at first glance seemed of interest. Surprisingly, any tools we tested never retrieved the structural template suggested by Yamaguchi *et al.* (21), the bacterial chloride channel (Protein Data Bank code 1OTS). When the corresponding template (*Escherichia coli* chloride-proton exchanger (CICA)) was imposed in I-TASSER, the resulting models did not respect the imposed topology, showing that the sequence-structure compatibility was not large enough to be imposed.

Hence, we mainly ended up with two different topologies. Model 1 is based on the Na⁺-glucose symporter, and model 2 is based on the uracil transporter. Note that both are cation symporters. A careful inspection of model 1 showed that (i) the C-terminal end was extracellular and thus not compatible with experimental data and (ii) the location of Lys⁸⁵¹ and Lys⁵³⁹ (intra- and extracellular, respectively) prevented their cross-linking by 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS) in disagreement with experimental data. Moreover, using alternative tools, we systematically retrieved the second template, *i.e.* Protein Data Bank code 3QE7. Supplemental Fig. 1 illustrates the structural alignment between AE1 transmembrane domain and uracil transporter (Protein Data Bank code 3QE7). In addition, the E-value and *p* value, which estimate the relevance of the alignment, led us to consider the proposed template. Hence, we focused on this model to identify helices forming the transport site.

We used the PPM server (22) to determine the limits of the transmembrane segments in the model (see supplemental Table 2). The topology of the model presents 12 transmembrane helical segments with two additional segments having a mixed structure, α -helix/coil. For convenience, the segments are numbered according to their predicted location in the membrane regardless of their secondary structure (Fig. 1).

There is a symmetry between TM4–5 and TM11–12, which form two inverted arches more or less of the same width. The helical parts of TM3 (in between TM4 and TM5) and TM10 (in between TM11 and TM12) point toward each other. TM1, TM2, and TM9 are located within the space delimited by TM4–5 and TM11–12. TM8 forms a long tilted helix spanning through this space parallel to the orientation of TM3 + TM10. TM6–7 and TM13–14 are arranged at the periphery of the structure. TM1–7 and TM8–14 structures are symmetrical (supplemental Fig. 2).

Note that the present model should be considered as a complementary tool to test new hypotheses and to guide experiments but should not be used to conduct intensive atomistic simulations. Nowadays, the tools, like QMEAN server, one of the most efficient tool available for assessing the accuracy of a structural model, are not appropriate to validate a transmembrane protein model (23). ProQM, the only tool available to assess membrane protein models, indicated that the quality of

the model is medium (24). However, the present model provides useful information regarding helix spatial organization that should be further validated experimentally. The results detailed in the next sections strongly support the relevance of the model despite its low resolution.

Mutagenesis in TM5 and TM3

It has been shown that TM8 lines the anion exchange pathway of AE1. In the selected model, TM8 appears as a long tilted helix. Viewed from the top, the pathway along TM8 that was shown to drive anions partially faces TM5. Moreover, TM3 is in between the top of TM8 and TM5 (Fig. 1B). Thus, the possibility for TM8, TM5, and TM3 to be involved in the formation of AE1 transport site was investigated.

Putative TM5 contains a highly conserved amino acid sequence among anion exchangers SLC4A1, -A2, and -A3 (F⁵³²IYE⁵³⁵), and especially Ile⁵³³ is present in all known SLC4 anion exchangers (supplemental Fig. 3). Moreover, the anion exchanger inhibitor DIDS covalently binds to Lys⁵³⁹ at the top of this putative TM5. However, this lysine is not directly involved in the transport site (25). It is possible to cross-link Lys⁵³⁹ with Lys⁸⁵⁰ by DIDS, and this induces a covalent inhibition of anion exchange. The selected model places Lys⁵³⁹ and Lys⁸⁵⁰ in a position compatible with their cross-linking.

In putative TM3, sequence G⁴⁶³FSGPL⁴⁶⁸ is conserved in vertebrate SLC4A1, -A2, and -A3, and it has been proposed to correspond to one of the chloride binding sites of ClC (consensus sequence GSGIP) (26). To determine the role of TM5 and TM3 in AE1 transport activity, a cysteine-scanning mutagenesis combined with sulfhydryl-specific chemical labeling was done.

In TM5, residues Ser⁵²⁵, Phe⁵²⁶, Ile⁵²⁸, Ser⁵²⁹, Leu⁵³⁰, Phe⁵³², Ile⁵³³, Tyr⁵³⁴, Glu⁵³⁵, Phe⁵³⁷, Lys⁵³⁹, Leu⁵⁴⁰, Ile⁵⁴¹, and Lys⁵⁴² were changed one by one for cysteine. A similar approach was used to study the involvement of TM3 residues Ser⁴⁶⁵, Leu⁴⁶⁸, Phe⁴⁷¹, Glu⁴⁷², Glu⁴⁷³, and Phe⁴⁷⁵. Ser⁴⁶⁵ was substituted with cysteine, isoleucine, or alanine. This amino acid was proposed to correspond to Ser¹⁰⁷ in Cl[−] channels, which are involved in anion translocation. Leu⁴⁶⁸, Phe⁴⁷¹, Glu⁴⁷², Glu⁴⁷³, and Phe⁴⁷⁵ were substituted with cysteine. All mutants were expressed in *Xenopus* oocytes, and their correct addressing to oocyte plasma membrane was assessed by immunodetection of biotinylated AE1 on Western blots (supplemental Fig. 4).

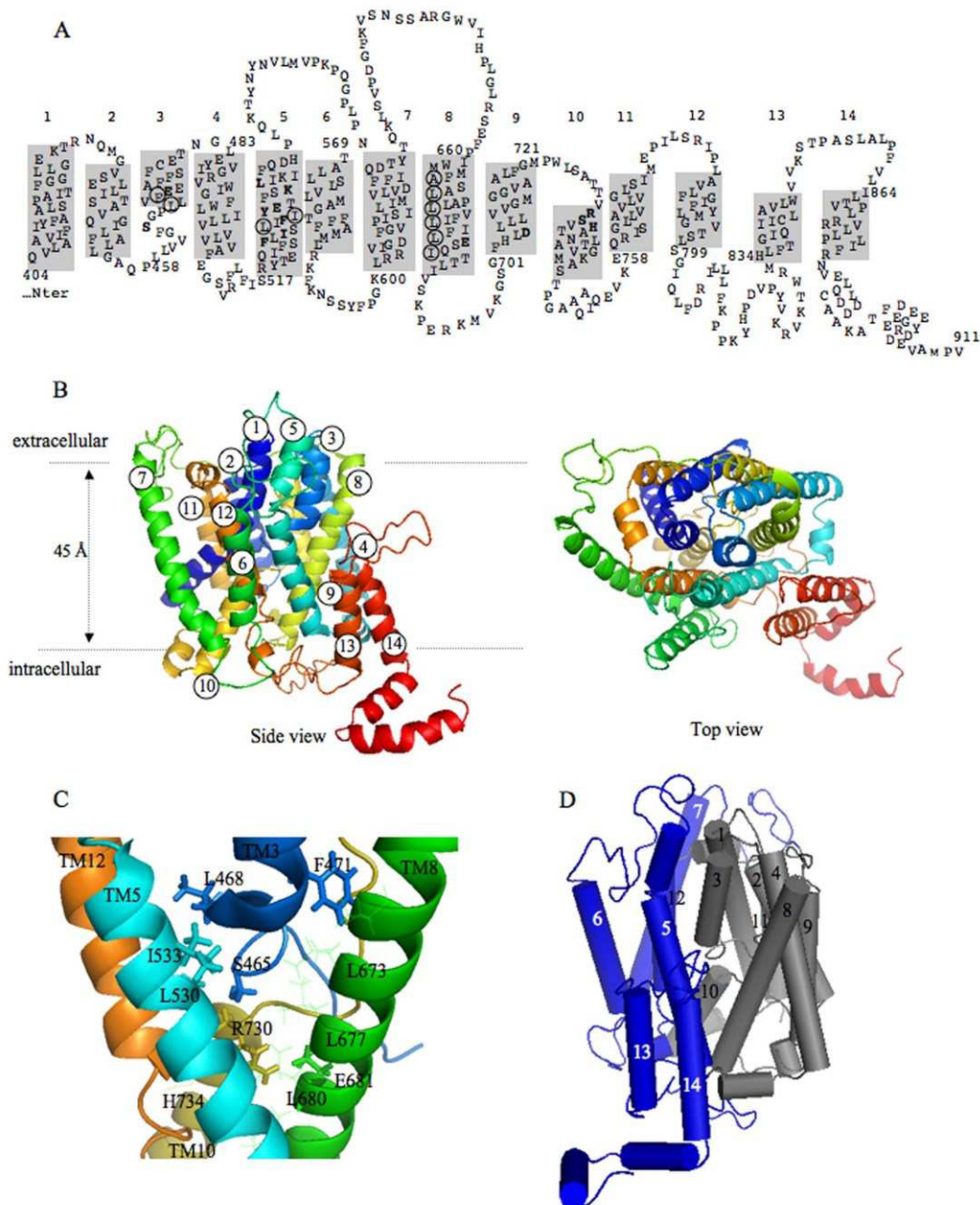
The variation of AE1 expression level at the plasma membrane is fairly high as visualized by the large S.E. This discrepancy could be linked to differences between batches of oocytes, but it is also due to the calculation method. These bars show the ratio of chemiluminescence associated with overexpressed AE1 over that associated with the endogenous β 1 subunit of the Na,K-ATPase. The large difference between these two signals emphasizes variations between experiments. Thus, it was not possible to establish statistically significant differences between mutants and WT AE1 with regard to their expression level except for S525C mutant in TM5 and S465A, E472C, and F475C in TM3 that were significantly less expressed than the WT AE1 in all experiments.

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

Transport Properties of the Mutants

Mutations in TM5—The anion exchange activity of cysteine mutants in TM5 was assessed. As shown by Fig. 2, all mutants were functional, *i.e.* able to exchange Cl^- and HCO_3^- , except for

I528C, F532C, and E535C. In these three mutants, loss or strong reduction of anion exchange ability is not due to a reduced expression of the protein in oocyte plasma membrane (supplemental Fig. 4B). Only the S525C mutant exhibited a decreased



Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

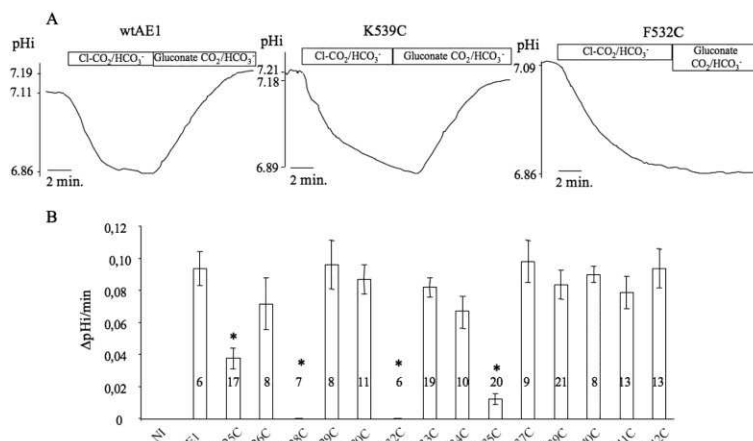


FIGURE 2. Anion exchange of WT AE1 and cysteine mutants in TM5. *A*, representative intracellular pH recordings in oocytes expressing WT AE1 and F532C and K539C mutants. Each trace comes from different experiments performed with different pH sensitive electrodes. *wtAE1*, wild-type erythroid AE1. *B*, the ability of oocytes to recover from an acid load in CO₂/HCO₃⁻ buffered MBS was expressed as ΔpH/min. This corresponds to the initial slope of the curve recorded in medium without Cl⁻. Data are means ± S.E. (error bars) of *n* (number in bars) oocytes from different batches (Student's *t* test; *, *p* ≤ 0.05).

anion exchange activity that is correlated to a decreased expression level of the protein. Thus, S525C mutation does not impair AE1 transport features but rather decreases the amount of protein at the plasma membrane. As previous experiments have shown that some AE1 point mutations induced a Na⁺ and K⁺ leak, the cation permeability of oocytes expressing WT and mutated AE1 was also assessed.

Oocyte Na⁺ and K⁺ contents were measured after 3 days of AE1 expression (Fig. 3A). To be able to compare data from different batches of oocytes with varying basal Na⁺ and K⁺ contents in control oocytes (non-injected (NI)), results were expressed as the difference in Na⁺ and K⁺ contents between oocytes expressing WT or mutated AE1 and non-injected oocytes. We observed that mutations F526C, I528C, F532C, Y534C, K539C, and L540C induced a significant increase in Na⁺ content correlated to a significant decrease in K⁺ content. Considering S.E. values, only changes over 20% of cation contents were considered as significant. Thus, variations between NI and AE1-expressing oocytes below 10 μmol/g of dry weight are not significant. To confirm the faint cation leak for Y534C and K539C mutants, oocytes were incubated for 5 days in MBS with ouabain and bumetanide. In this case, ΔNa⁺ = +26.6 ± 8.6 μmol/g d.w. and ΔK⁺ = -21.1 ± 4.5 μmol/g d.w. for Y534C and ΔNa⁺ = +22.8 ± 6.3 μmol/g d.w. and ΔK⁺ = -27.6 ± 5.7

μmol/g d.w. for K539C. By contrast, E535C mutant did not leak Na⁺ or K⁺ after 5 days in MBS with ouabain and bumetanide.

The cation permeability was also assessed by Li⁺ influx measurements (Fig. 3B). All the mutants able to change oocyte Na⁺ and K⁺ contents exhibited a significant Li⁺ influx. The Li⁺ influx measured in oocytes expressing E535C was slightly above control levels. However, this low increase in cation permeability was not associated with changes in Na⁺ and K⁺ content in contrast to L540C for which a low Li⁺ influx was also detected. We did not further investigate the significance of the low Li⁺ influx of E535C-expressing oocytes.

To assess whether TM5 lines the transport site, the anion exchange activity and the cation transport activity (when observed) were measured after binding of the following thiol reagents with different sizes and charges: MTSEA (cationic/neutral, 10:1 at pH 7.5), MTSET (cationic), MTSES (anionic), and PCMBs (anionic). We observed that PCMBs blocked anion exchange through L530C and I533C mutants (Fig. 4A) by 80 and 70%, respectively. Neither MTSEA nor MTSES at 5 mM inhibited anion exchange in oocytes expressing WT or cysteine mutants. For clarity, these data were not plotted in the figure. For the four mutants inducing a cation leak (F528C, F532C, Y534C, and K539C), Li⁺ influx was insensitive to PCMBs, MTSET, and MTSEA.

FIGURE 1. Human AE1 topology (A), three-dimensional model (B), and spatial organization of the transport domain (C and D). *A*, topology of AE1 membrane-spanning domain deduced from the three-dimensional model. The gray rectangles represent α-helices spanning the membrane bilayer. Circles highlight residues that are along the ion pathway through the protein. Some amino acids that have been shown to be important for AE1 transport features are in bold: Glu⁶⁸¹ in TM8; Asp⁷⁰⁵ in TM9; and Arg⁷³⁰, Ser⁷³¹, and His⁷³⁴ in TM10 from previous publications and Ser⁴⁶⁵ in TM3 and Phe⁵²⁶, Ile⁵²⁸, Phe⁵³², Tyr⁵³⁴, Glu⁵³⁵, Lys⁵³⁹, and Leu⁵⁴⁰ in TM5 from the present experiments. *B*, dotted lines indicate putative lipid bilayer width. The short size of TM13 and TM14 is similar to what is observed in uracil transporter UraA where they are halfway into the membrane. In the connecting loop between TM13 and TM14 lies the Lys⁸⁵¹ that cross-reacts with Lys⁵³⁹ in the top part of TM3 through covalent binding to DIDS (the distance between the two lysines is compatible with the size of DIDS molecule, i.e. 20 Å). *C*, enlargement of the center for ion transport. Amino acids that have been experimentally shown to be involved in ion transport are highlighted: Leu⁴⁶⁸, Phe⁴⁷¹, and Ser⁴⁶⁵ in TM3; Glu⁶⁸¹ in TM8; Leu⁵³⁰ and Ile⁵³³ in TM5; and Arg⁷³⁰ and His⁷³⁴ in TM10. For clarity, only TM12-5-3-10 and TM8 are shown in this side view. In TM8, amino acids lining the ion transport site are also shown. *D*, extrapolation to AE1 of the functional organization of UraA. A core domain (gray) and a gate domain (blue) that associate with each other through hydrophobic interactions are shown. Figures were prepared with PyMOL. *Nter*, N terminus.

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

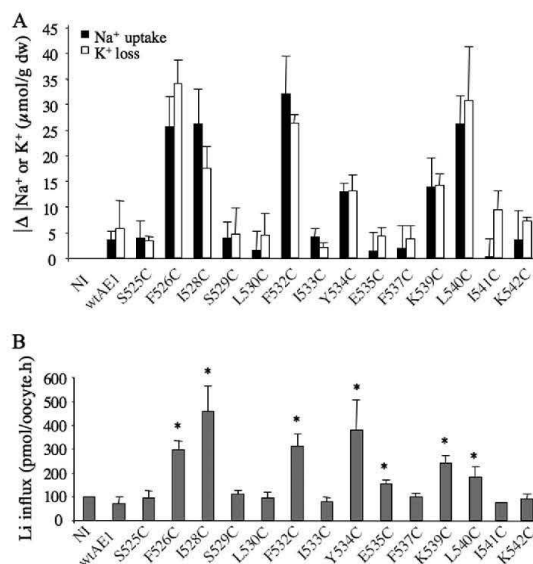


FIGURE 3. Cation permeability of oocytes expressing WT AE1 and cysteine mutants in TM5. A, Intracellular Na⁺ and K⁺ were measured in oocytes 3 days after injection and incubation in MBS with ouabain and bumetanide. The variation in Na⁺ and K⁺ contents between control, NI oocytes, and AE1-injected oocytes was calculated for each experiment. The absolute value of these variations was averaged, and data are means ± S.E. (error bars) of three to six different experiments depending on mutants. The mean value for Na⁺ content in NI oocytes is 50.1 ± 4.5 μmol/g d.w. (n = 14). The mean value for K⁺ content in NI oocytes is 59.2 ± 5.5 μmol/g d.w. (n = 14). wtAE1, wild-type erythroid AE1. B, Li⁺ influx ratio in oocytes expressing WT AE1 and cysteine mutants. To be able to compare experiments with varying basal Li⁺ influx in NI oocytes (from a minimum of 42 to a maximum of 250 pmol/h-oocyte depending on oocyte batches; mean, 139 ± 20 pmol/h-oocyte; n = 15 independent experiments), Li⁺ influxes in oocytes expressing WT or mutated AE1 were normalized to the basal Li⁺ influx in each experiment. Data are expressed as percentage of NI as means ± S.E. (error bars) of three (WT AE1, S525C, F526C, S529C, L530C, I533C, F537C, L540C, I541C, and K542C), five (F532C and K539C), or seven (I528C, Y534C, and E535C) different experiments (Student's t test; *, p ≤ 0.05).

Mutations in TM3—Fig. 4B illustrates the anion exchange activity of mutants in TM3. S465C, S465A, L468C, F471C, and F475C were still able to exchange Cl[−] and bicarbonate. By contrast, S465I and E472C abolished anion exchange activity, whereas E473C drastically reduced anion exchange activity. E472C was hardly detectable at the plasma membrane; thus, it is not possible to make conclusions about the effect of this mutation on anion exchange activity *per se* (supplemental Fig. 3C). S465I and E473C on the other hand were expressed at the plasma membrane, and the lack of anion exchange activity of these mutants points to a role for Ser⁴⁶⁵ and Glu⁴⁷³ in the transport process. The effect of PCMBs binding to cysteine mutants in TM3 was then assessed. This reagent strongly decreased anion exchange of L468C and F471C mutants (Fig. 4B). None of the substitutions on TM3 residues induced a cation leak (evaluated by cation content after 3 days in MBS with ouabain and bumetanide).

Involvement of TM5 and TM3 in Cation-leaky AE1—In previous studies, it was shown that H734R mutation converted the anion exchanger into a cation conductance (5). The H734R

mutation is associated with a hereditary stomatocytosis (9). The question arises as to whether the cation leak induced by H734R mutation was sensitive to cysteine mutations in TM5 or TM3 and whether this cation leak could be blocked by sulfhydryl reagents binding cysteine in TM5 or TM3.

The following double mutants, H734R and cysteine substitutions in TM5 that did not induce a cation leak *per se*, were constructed: S525C/H734R, S529C/H734R, L530C/H734R, I533C/H734R, E535C/H734R, F537C/H734R, L540C/H734R, I541C/H734R, and K542C/H734R. Moreover, another double mutant, F526C/H734R, a Cys mutant able to induce a cation leak, was also constructed. The Li⁺ influx induced by H734R mutations alone is greater than the Li⁺ influx induced by single cysteine mutations in TM5 (Fig. 5A compared with Fig. 3B). Moreover, we observed that an additional cysteine substitution in H734R mutant at the following positions increased the Li⁺ influx: F526C, S529C, F537C, L540C, and I541C. The greater Li⁺ permeability of F526C/H734R, S529C/H734R, F537C/H734R, L540C/H734R, and I541C/H734R double mutants is not explained by a higher amount of protein at the plasma membrane (supplemental Fig. 5).

The effect of chemical reagent binding on accessible cysteine was then assessed on these double AE1 mutants. Oocytes expressing AE1 H734R/Cys double mutants in TM5 were treated with MTSET, MTSEA, or PCMBs prior to Li⁺ influx measurement. Fig. 5B shows that two positions, Cys⁵³⁰ and Cys⁵³³, were affected by MTSET and/or PCMBs treatment in H734R mutant. MTSET inhibited by 25% Li⁺ influx of oocytes expressing L530C/H734R mutant, whereas PCMBs and MTSET inhibited by 45 and 33%, respectively, Li⁺ influx of oocytes expressing I533C/H734R. As MTSEA (5 mM) did not significantly change Li⁺ influx of any double mutants, these results were not plotted in Fig. 5 to avoid confusion.

Thus, positions Cys⁵³³ and Cys⁵³⁰ are both accessible in the anion exchange conformation of WT AE1 and in the cation leaky conformation of H734R mutant. Moreover, they are involved in the anion exchange activity as well as in the cation leak.

As it was observed that PCMBs blocked anion exchange of two cysteine mutants in TM3 (L468C and F471C), the involvement of these two positions in the cation leak induced by H734R mutation was also assessed. Moreover, the involvement of Ser⁴⁶⁵ was also checked on cation leak induced by H734R mutation. Double mutants L468C/H734R, F471C/H734R, and S465I/H734R were constructed, and their expression level at the plasma membrane was not significantly different from that of WT AE1 (supplemental Fig. 5). Fig. 6 illustrates the Li⁺ influx of L468C/H734R, F471C/H734R, and S465I/H734R constructs. This influx was not inhibited by 1 mM PCMBs or 10 mM MTSET treatment. Remarkably, a strong reduction of Li⁺ influx was observed in oocytes expressing S465I/H734R mutants, suggesting the importance of Ser⁴⁶⁵ in the cation leak induced by H734R mutation.

DISCUSSION

The goals of the present experiments were to identify the ion transport site within AE1 membrane-spanning domain and to propose a spatial organization of this domain. The AE1 model is

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

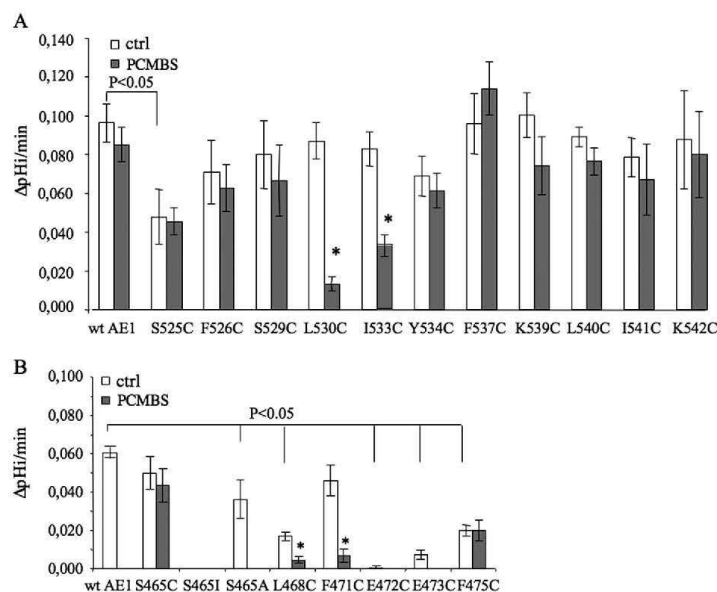


FIGURE 4. Effect of PCMBs on anion exchange activity of WT and mutated AE1. White bars represent control condition. Gray bars represent pH_i recovery of oocytes treated for 15 min with 1 mM PCMBs prior to intracellular pH recording. Data are means \pm S.E. (error bars) of 10 oocytes from different experiments. The control (*ctrl*) condition and sulfhydryl reagent condition were recorded on oocytes from the same batch of injection (Student's *t* test between control and PCMBs condition; *, $p \leq 0.05$). *A*, cysteine substitutions in TM5. *B*, amino acid substitutions in TM3. The different level of WT AE1 anion exchange activity between *A* and *B* could reflect the different periods of time at which the experiments on TM3 and TM5 mutants were done. The mean Δ pH/min for WT AE1 is 0.063 with a standard error of 0.030 ($n = 41$ recordings over 2 years).

based on the structure of UraA, the uracil-H⁺ cotransporter (27). At first glance, this result is unexpected for an electroneutral anion exchanger, which is more likely compared with chloride channel family members. Indeed, a recent interpretation of electron density maps of AE1 crystals proposed some similarities with Cl⁻ channel structure (21). Some long and tilted helices could be identified in AE1 crystals, and two V-shaped densities inserted into the membrane from opposite sides were also identified. These V-shaped helices are found in Cl⁻ channel structure (28). However, V-shaped helices are also found in H⁺ or Na⁺ symporters. In addition, amino acid sequence similarity between AE1 membrane-spanning domain and UraA or ClCA does not favor the chloride channel, these sequences are quite similar. Nevertheless, although all the tools we used failed to identify ClCA as an appropriate template, we built homology models using two different alignments. Whatever the alignments, the results did not match available functional and topological data. For instance, residues Leu⁵³⁰, Ile⁵³³, Leu⁶⁶⁹, Leu⁶⁷³, Leu⁴⁶⁸, and Phe⁴⁷¹ shown to influence transport properties were far away in the models based on ClCA. The region from Arg⁸⁰⁸ to Leu⁸³⁵ that was shown to be intracellular on the basis of antibody recognition (42) is exposed to the extracellular medium in the model based on ClCA. All these results tend to confirm that that UraA template would be more appropriate.

It should be noted that UraA structure is also a double funnel shape structure related by an internal 2-fold symmetry. This kind of structure, observed in Na⁺ symporters for example, allows transport of many different solutes: amino acids, sugar,

nucleobase, glycerol, and water with H⁺, Na⁺, K⁺, and/or Cl⁻ ions (28–31). As mentioned previously, AE1 is able to transport amino acids, urea, Na⁺, and K⁺ and form an anion conductive pathway in trout erythrocytes (5, 12, 13, 15, 16). Point mutations convert the electroneutral human AE1 into a Na⁺ and K⁺ conductance (5). To some extent, AE1 shows transport similarities with the glutamate transporter, an anion channel with glutamate, Na⁺, and K⁺ permeability, that has a structure related to Na⁺-coupled transporters (29).

The three-dimensional AE1 model presents 14 transmembrane segments arranged into two structural repeats, TM1–7 and TM8–14 (supplemental Fig. 2). The N-terminal and C-terminal parts are cytoplasmic. As for UraA, two transmembrane segments are partly helical, TM3 and TM10, and these two half-helices are superimposed. In UraA, these semihelical membrane-spanning segments are crucial for uracil binding and present a short β -strand that is not observed in the AE1 model. Similar discontinuous helices symmetrically related are also observed in neurotransmitter-, amino acid-, and sugar-sodium symporters and account for substrate binding (32). As shown in Fig. 1*B*, *Top view*, AE1 membrane-spanning domain can be divided into two parts: the transmembrane segments 1–2–3–4–8–9–10 and 11 on one hand and the transmembrane segments 5–6–7–12–13 and 14 on the other hand. The relevance of the proposed three-dimensional structure for AE1 can be assessed by comparison with the available data accumulated over more than 50 years to describe AE1 topology and functioning.

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

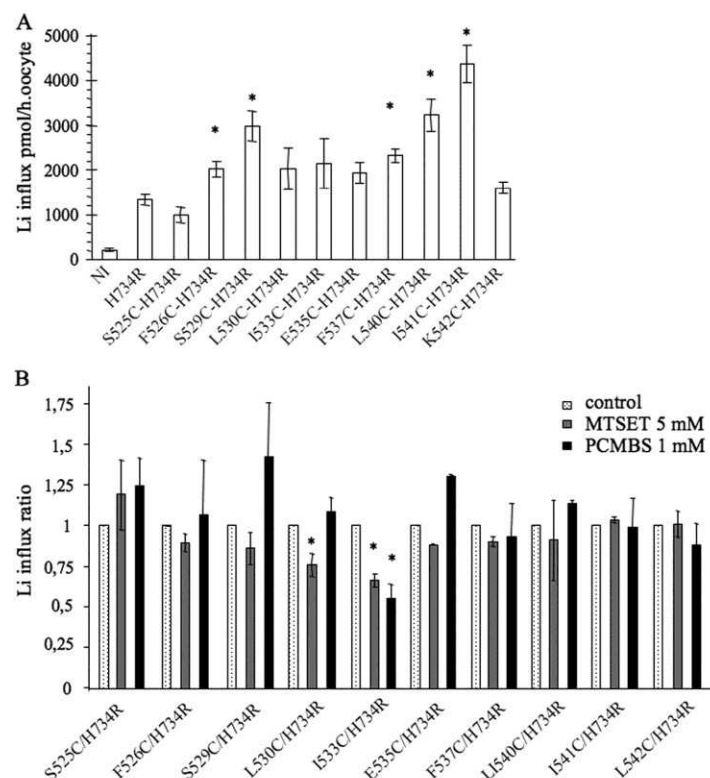


FIGURE 5. Li⁺ influx in oocytes expressing cation-leaky AE1. A, Li⁺ influx in oocytes expressing H734R mutant and H734R/Cys double mutants in TM5. Data are means \pm S.E. (error bars) of three to five different experiments. B, effect of sulfhydryl reagents on Li⁺ influx induced by expression of H734R/Cys double mutants in TM5. For each experiment, the Li⁺ influx for control condition was set at 100 pmol/h.oocyte, and Li⁺ influx in MTSET- (0.5 mM) or PCMBs (1 mM)-treated oocytes was normalized to this value. Data are means \pm S.E. (error bars) of three different experiments (Student's *t* test; *, *p* \leq 0.05).

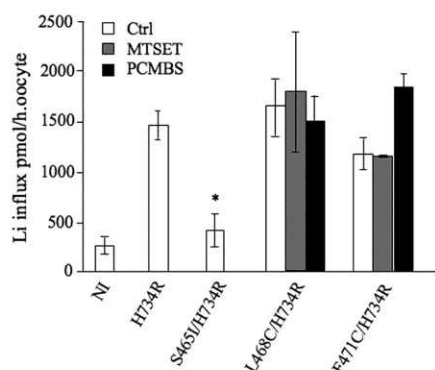


FIGURE 6. Li⁺ influx in oocytes expressing double mutants (H734R and point mutations in TM3). Data are means \pm S.E. (error bars) of three different experiments (Student's *t* test; *, *p* \leq 0.05). Only oocytes expressing L468C/H734R and F471C/H734R were treated with PCMBs (1 mM) or MTSET (5 mM). Ctrl, control.

A great number of experiments have been carried out to determine AE1 topology. These data have led to two different propositions: one with 13 α -helices and a loop connecting the

extracellular C-terminal part of α -helix 11 and the intracellular N-terminal part of α -helix 12 and one with 14 α -helices (33–37). These two topologies differ mainly after TM9 (Gly⁷¹⁴) with either five α -helices spanning the lipid bilayer or four α -helices with a re-entrant loop between α -helix 11 and 12 (residues 808–835). In our model, TM10 (residues Pro⁷²² to Gln⁷⁵²) corresponds to a transmembrane segment. Experimental evidence has long questioned the sidedness of this region. The amino acids in this region have been proposed to form an extracellular loop on the basis of *N*-glycosylation-scanning mutagenesis in a cell-free system or in transfected cells. Cysteine-scanning mutagenesis also favored this orientation (37). However, in this domain, Lys⁷⁴³ was shown to be accessible from the extracellular side or intracellular side depending on the kind of experiments (38, 39). Kanki *et al.* (40) have proposed an explanation to these contradictory observations, and they concluded that during synthesis this region is accessible from the extracellular side, and it is later occluded within the AE1 molecule. This sequestration requires TM1–3 and TM11. In the present model, this domain forms a transmembrane span (TM10) that is in accordance with the experiments of Kuma *et al.* (41) showing

TABLE 1**Summary of experimental data**

For plasma membrane immunodetection, ++ refers to the immunodetection level of WT AE1, and + indicates that the protein was immunodetected at a lower level than WT. All constructs were immunodetected. For anion exchange activity, there were five levels of signal ranging from +++ to -- (no signal at all). +++ refers to anion exchange activity of WT AE1, -- indicates very faint signal (0.01 ΔpH/min), + indicates anion exchange activity around 0.02 ΔpH/min, and ++ indicates that anion exchange activity was reduced by about half compared with WT. For Na⁺ and K⁺ leak, + indicates the presence of cation leak, and -- indicates the absence of cation leak.

AE1 amino acid substitutions	Plasma membrane immunodetection	Anion exchange activity	Na ⁺ and K ⁺ leak	Transport sensitivity to thiol alkylation
WT AE1	++	+++	--	None
TM3				
S465C	++	+++	--	None
S465I	++	---	--	None
S465A	+	++	--	None
L468C	++	+	--	PCMBs
F471C	++	+++	--	PCMBs
E472C	+	---	--	None
E473C	++	+	--	None
F475C	+	+	--	None
TM5				
S525C	+	++	--	None
F526C	++	+++	+	None
I528C	++	---	+	None
S529C	++	+++	--	None
L530C	++	+++	--	MTSET (cation transport), PCMBs (anion transport)
F532C	++	---	+	None
I533C	++	+++	--	PCMBs (anion and cation transport), MTSET (cation transport)
Y534C	++	+++	+	None
E535C	++	--	--	None
F537C	++	+++	--	None
K539C	++	+++	+	None
L540C	++	+++	+	None
I541C	++	+++	--	None
K542C	++	+++	--	None

that Lys⁷⁴³ is cleaved by intracellular proteases but not by extracellular proteases in red cells.

The next two TMs, TM11 and TM12, are therefore oriented in the opposite direction compared with the topology proposed by Zhu *et al.* (33), and the long loop between TM12 and TM13 (Arg⁸⁰⁸ and Leu⁸³⁵) is intracellular. Wainwright *et al.* (42) have shown that this loop corresponds to an intracellular loop on the basis of antibody recognition (BRIC 132).

The controversy regarding the topology of the two regions corresponding roughly to residues 720–760 and 808–835 has recently been summarized by Hirai *et al.* (43). They proposed two different topologies of AE1 (a and b) combining published data and their analysis of the electron density maps of AE1 crystals. Our present model favors the topology called b with region 720–760 forming a transmembrane segment and region 808–834 being an intracellular loop connecting TM12 and TM13. Moreover, this model fits nicely with the working model proposed by Groves and Tanner (35). By co-expressing pairs of complementary fragments of AE1 combined with co-immunoprecipitation in non-denaturing detergent solutions, they suggested that the core of the protein might comprise two subdomains containing the closely interacting TM spans 1–5 and TM spans 9–12. The region containing TM spans 6–7 and 13–14 were proposed to be at the periphery of the core structure. In addition, it has been shown that deletion of TM6 and TM7 from full-length AE1 does not prevent anion exchange activity (12). However, this deletion changes AE1 transport features because the protein develops an anion conductance in place of an anion exchange. Thus, these two TMs are not required for anion exchange but impose the electroneutral transport behavior of anion exchange. Two AE1 point muta-

tions, R589H and S613F, associated with distal renal tubular acidosis are located in TM6 and TM7, and they induce a cation leak in a still functional anion exchanger (7). TM6 and TM7 are not part of the ion path but probably participate in connecting TMs involved in this function.

It is possible to reconstitute a functional anion exchanger by co-expressing two independent cDNAs, one coding for the N-terminal part of the protein until the end of putative TM5 and one coding for the C-terminal part of the protein starting in putative TM6 (35). This suggests that the first five membrane-spanning helices adopt a three-dimensional functional structure independently of the next TM segments. Moreover, it has been shown that cutting this structure after putative TM4 did not allow recovery of a functional anion exchanger. Thus, the control of TM5 position by its link to TM4 appears to be essential for anion exchange activity.

The model shows that TM3 and TM5 share contacts with TM8, which has been proposed to line the anion exchange pathway. Thus, it was hypothesized that TM3 and TM5 could be involved in the AE1 transport site, and cysteine-scanning mutagenesis was done on conserved positions of these segments. The results of amino acid substitutions in TM3 and TM5 are summarized in Table 1.

Among known sequences of anion exchangers (SLC4A1, -A2, and -A3), there is a conserved consensus sequence in TM3: G⁴⁶³F(S/T)GP(L/V)(L/M)(L/V)F(E/D)E⁴⁷³A(F/Y/L)(F/Y/N/M)XF(C/S)⁴⁷⁹. In the model, the helical part of TM3 starts at Val⁴⁷⁰. Substitutions S465I and E473C abolished the anion exchange activity, whereas thiol reagent binding on L468C and F471C mutants prevented anion exchange, thus showing the involvement of TM3 in transport activity of AE1. In addition,

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

some mutations are probably responsible for AE1 misfolding as shown by reduced immunodetection at the plasma membrane of S465A, E472C, and F475C mutants. In zebra fish, the retina mutation corresponding to E472G substitution leads to the absence of anion exchanger in erythrocyte membrane (44). Altogether, these results indicate the importance of Glu⁴⁷² in TM3 for proper folding of AE1 and probably of all anion exchangers because this Glu is highly conserved (it could be an Asp in invertebrates). Moreover, Ser⁴⁶⁵ also appears to be important for AE1 folding because its substitution by Ala led to a lower detection of the protein at the plasma membrane. However, this protein was still able to exchange anions. Thus, a polar residue does not seem important in position 465 for anion exchange activity. The size of the lateral chain is probably more important because S465I mutation prevented the anion exchange activity of AE1 without impairing protein expression. Further studies simulating the effects of amino acid substitutions on the model would help to better understand how Ser⁴⁶⁵ is involved in the transport mechanism and folding of the protein. Another amino acid substitution in TM3 of human AE1, C479W, was shown to impair AE1 trafficking to the plasma membrane as well as anion exchange activity (45).

Thus, our present results confirm the role of TM3 in AE1 folding and show in addition its involvement in anion exchange activity. Especially residues Ser⁴⁶⁵, Leu⁴⁶⁸, Phe⁴⁷¹, and Glu⁴⁷³ appear to play a role in anion translocation. Further experiments should be done to better understand how these amino acids are involved in the transport process.

Cysteine-scanning mutagenesis in TM5 showed that mutants L530C and I533C react with thiol reagents, which prevent anion exchange. This suggests that these residues are involved in anion access to the AE1 transport site. Unlike Ile⁵³³, which is conserved in the family of anion exchangers, Leu⁵³⁰ can be substituted with other non-polar residues (Ala in skate AE3 and Val or Phe in invertebrate AE).

It is not possible to block anion exchange with thiol reagent binding to positions below Leu⁵³⁰ and above Ile⁵³³ along a line facing the space between TM5–3 and TM8. This could be interpreted either as limited access of the reagent to these positions or as an absence of blocking of the anion exchange when bound. This interpretation suggests that access to the transport site is too large above Ile⁵³³ to be blocked by PCMBs, which is 9 Å long with the thiol function (6.5 Å alone). Thus, the transport site should narrow below Ile⁵³³. The model shows that the distance between TM5 and TM8 narrows between the facing residues Ile⁵³³ in TM5 and Leu⁶⁷³ in TM8 (6.5 Å), which is compatible with the blocking effect of PCMBs binding to Cys⁵³³ as well as to Cys⁶⁷³ in TM8 (19). Another interpretation of PCMBs blocking could be that its binding to TM5 prevents helix movements involved in transport process.

We observed that some substitutions of amino acids in TM5 are associated with changes in AE1 transport features. E535C dramatically reduced anion exchange activity. I528C and F532C mutations abolished the anion exchange activity and induced a cation leak. F526C, Y534C, K539C, and L540C mutations did not prevent anion exchange but induced a cation leak. The Na⁺ and K⁺ gradients were dispelled by a ouabain- and bumetanide-insensitive pathway. Thus, some positions in TM5

are crucial for AE1 transport features. It was already known that either AE1 could be converted into a cation conductance or that a cation conductance could be observed in a still functional anion exchanger. These peculiar transport features result from specific point mutations in the transmembrane domain (such as H734R in TM10), and some of these point mutations are associated with hereditary red cell or renal diseases (5, 7–10, 46). Our present results extend to TM5 the list of amino acids that, when substituted in AE1, induce a Na⁺ and K⁺ leak in *Xenopus* oocytes. With F526C, Y534C, K539C, and L540C mutations, AE1 carries anion exchange and cation leak activities. With I528C and F532C mutations, there is no more anion exchange activity; the exchanger is converted into a cation leak.

The intensity of the cation leak induced by cysteine substitutions in TM5 is weak compared with the cation leak induced by H734R single mutation (for H734R-expressing oocytes, the Li⁺ influx is about 15 times higher than the control, whereas for cysteine mutants in TM5, it is between 2 and 4 times higher than the control). Differences in the expression levels of the proteins in oocyte plasma membrane do not account for this observation. This should rather mean that the cation pathway induced by H734R mutation is more permeable than that induced by cysteine substitutions in TM5. The fact that different point mutations lead to varying intensities of the ouabain- and bumetanide-insensitive cation leak but similar plasma membrane protein content favors the hypothesis of a leak through AE1 rather than through an endogenous transporter. Moreover, some cysteine substitutions in TM5 were able to increase the cation leak of H734R mutant, corroborating the involvement of TM5 in cation permeability.

The question of a unique transport pathway in AE1 accounting for anion exchange and/or cation leak has been addressed in a previous publication (11). It was observed that thiol reagent binding on cysteine residues in TM8 could block anion exchange on WT AE1 or cation leak in H734R point-mutated AE1. The present results with L530C and I533C substitutions in H734R AE1 show that the cation leak could be partly blocked by PCMBs binding on Cys⁵³⁰ or Cys⁵³³. Consequently, like TM8, TM5 participates in the anion exchange activity of WT human AE1 and in the cation leak activity of point-mutated H734R AE1. However, cation leak inhibition is lower than anion transport inhibition (Figs. 5B and 4A). This suggests that in H734R-mutated AE1 a path still large enough with PCMBs binding on Cys⁵³⁰ or Cys⁵³³ accounts for some Li⁺ transport.

The similarity between uracil transporter UraA and the AE1 model suggests that the two proteins should share a common transport mechanism. The uracil transporter UraA is organized into a core domain (TM1–4 and TM8–11) and a gate domain (TM5–7 and TM12–14). The interface between these two domains involves hydrophobic contacts of TM5 and TM12 in the gate domain with TM3–8 and TM10 in the core domain. The substrate binding site is located in a pocket formed at the junction of TM3 and TM10 α -helical parts. In this pocket, uracil is coordinated with residues in TM8 (Glu²⁴¹ and His²⁴⁵), TM3 (Phe⁷³), TM10 (Gly²⁸⁹ and Glu²⁹⁰), and TM12 (Tyr³⁴²) (27). UraA is a proton-coupled symporter. It is proposed that substrate-free UraA is outward-open with the two negative charges of Glu (241 and 290) preventing closure of the gate

domain onto the core domain. The proton is translocated from Glu²⁴¹ or Glu²⁹⁰ to His²⁴⁵, and this translocation induces a rotation of the gate domain around the bound uracil. Then transporter conformation changes from outward-open to inward-open. Along TM8, substitution of Glu²⁴¹ or His²⁴⁵ by an Ala abolished uracil transport.

It is noteworthy that, in AE1, TM8 also lines the AE1 transport site (19), and along this helix, Glu⁶⁸¹ is involved in the electroneutral anion exchange activity of the protein (18). There is 62% similarity between UraA TM8 and AE1 TM8 primary sequences, and the size of the helices is the same. The two Glu residues important for protein function are not at the same level along the helix: Glu⁶⁸¹ in AE1 is one helix turn lower than Glu²⁴¹ in UraA TM8 (supplemental Fig. 6). Glu⁶⁸¹ in AE1 was proposed to lie within the transport pathway and to be alternatively exposed to the intracellular and extracellular media (18, 47, 48). Interestingly, Glu⁶⁸¹ in the present model is in the vicinity of residues His⁷³⁴, Ser⁷³¹ (in TM10), and Asp⁷⁰⁵ (in TM9). Point mutations leading to H734R, S731P, and D705Y substitutions (responsible for hereditary stomatocytosis) block anion exchange and induce a cation conductance in AE1 (5, 9). The work from Zaki *et al.* (47) has shown that two arginyl residues in AE1 membrane-spanning domain are involved in the anion binding site. These arginines were identified as Arg⁴⁹⁰ (extremely conserved residue in SLC4) and Arg⁷³⁰ (conserved in SLC4A1, -A2, and -A3). In our model, the side chain of Arg⁴⁹⁰ in TM4 protrudes toward the helical part of TM3, whereas Arg⁷³⁰, located at the beginning of the TM10 helical part, faces Glu⁶⁸¹ in TM8 (Fig. 1C). Arg⁷³⁰ in AE1 TM10 corresponds to Glu²⁹⁰ in UraA TM10. These residues in their respective transporter are deeply involved in the transport activity of the proteins. E290A substitution in UraA abolishes uracil transport, whereas R730C substitution abolishes anion exchange activity of AE1 (49).

In addition to TM8, TM3 might also be involved in the AE1 transport pathway as it is in uracil transporter. Phe⁴⁷¹ was shown to be accessible to thiol reagent blocking when substituted with a cysteine. In UraA, a Phe (Phe⁷³) is also found in a similar position along TM3 (supplemental Fig. 6). This Phe⁷³ can be substituted with an Ala without impairing uracil transport; however, this bulky residue together with His²⁴⁵ in TM8 is proposed to insulate substrate from the outside environment. Finally, TM5 appears to face the AE1 transport pathway and to control the size or the shape of this passage. Positions Phe⁵²⁸, Leu⁵³⁰, and Ile⁵³³ in AE1 correspond to Ile¹³², Leu¹³⁶, and Val¹³⁹, respectively, in UraA. In UraA, these residues mediate interaction of the gate domain with the core domain. In the upper part of AE1 TM5, Tyr⁵³⁴, Phe⁵³⁷, Lys⁵³⁹, and Lys⁵⁴² face Leu⁴⁶⁸, Glu⁴⁷², Glu⁴⁷³, and Phe⁴⁷⁵ in TM3. Substitutions on most of these residues were shown to affect anion exchange activity. This suggests that these contacts are required for proper functioning of AE1.

According to UraA transporter functioning and similarities between UraA and AE1 regarding amino acids crucial for transport, it could be proposed that the extracellular side of TM1, TM2, TM3, TM8, and TM9 should circumscribe the AE1 outside vestibule, providing access for the extracellular medium. The intracellular part of TM5, TM8, TM10, and TM12 with the

loop connecting TM12 and TM13 should circumscribe the inside vestibule, providing access for the intracellular medium. A core domain consisting of TM1, TM2, TM3, TM4, TM8, TM9, TM10, and TM11 would interact with a gate domain (TM5, TM6, TM7, TM12, TM13, and TM14) (Fig. 1D). A tilt of the gate domain should open and close the extracellular medium access to the transport binding site formed around the helical extremities of TM3 and TM10.

AE1 structure should enable anion exchange by a movement of the protein that is compatible with the opening of a leak for Na⁺ and K⁺. The present three-dimensional model provides a useful basis to design further experiments to understand how a unique ion pathway within AE1 protein could exchange anions and/or leak cations. The model could help identification of helices in AE1 crystals, and it is a starting point to model point mutations and to study their involvement in the organization and functioning of the transport domain *in silico* and *in vivo*.

Acknowledgment—We are grateful to Dr. Céline Feillet for precious help in editing the manuscript and helpful comments.

REFERENCES

- Bamberg, E., and Passow, H. (eds) (1992) *The Band 3 Proteins: Anion Transporters, Binding Proteins and Senescent Antigens*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Chu, H., and Low, P. S. (2006) Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem. J.* **400**, 143–151
- Lindenthal, S., and Schubert, D. (1991) Monomeric erythrocyte band 3 protein transports anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6540–6544
- Pucéat, M., Korichneva, I., Cassoly, R., and Vassort, G. (1995) Identification of band 3-like proteins and Cl[−]/HCO₃[−] exchange in isolated cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 1315–1322
- Guizouarn, H., Martial, S., Gabillat, N., and Borgese, F. (2007) Point mutations involved in red cell stomatocytosis convert the electroneutral anion exchanger 1 to a nonselective cation conductance. *Blood* **110**, 2158–2165
- Ellory, J. C., Guizouarn, H., Borgese, F., Bruce, L. J., Wilkins, R. J., and Stewart, G. W. (2009) Review. Leaky Cl[−]/HCO₃[−] exchangers: cation fluxes via modified AE1. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**, 189–194
- Walsh, S., Borgese, F., Gabillat, N., Unwin, R., and Guizouarn, H. (2008) Cation transport activity of anion exchanger 1 mutations found in inherited distal renal tubular acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F343–F350
- Walsh, S., Borgese, F., Gabillat, N., and Guizouarn, H. (2009) Southeast Asian AE1 associated renal tubular acidosis: cation leak is a class effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 668–672
- Bruce, L. J., Robinson, H. C., Guizouarn, H., Borgese, F., Harrison, P., King, M. J., Goede, J. S., Coles, S. E., Gore, D. M., Lutz, H. U., Ficarella, R., Layton, D. M., Iolascon, A., Ellory, J. C., and Stewart, G. W. (2005) Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat. Genet.* **37**, 1258–1263
- Iolascon, A., De Falco, L., Borgese, F., Esposito, M. R., Avvisati, R. A., Izzo, P., Piscopo, C., Guizouarn, H., Biondani, A., Pantaleo, A., and De Franceschi, L. (2009) A novel erythroid anion exchange variant (Gly796Arg) of hereditary stomatocytosis associated with dyserythropoiesis. *Haematologica* **94**, 1049–1059
- Barneaud-Rocca, D., Borgese, F., and Guizouarn, H. (2011) Dual transport properties of anion exchanger 1: the same transmembrane segment domain is involved in anion exchange and in a cation leak. *J. Biol. Chem.* **286**, 8909–8916
- Parker, M. D., Young, M. T., Daly, C. M., Meech, R. W., Boron, W. F., and Tanner, M. J. (2007) A conductive pathway generated from fragments of

Structural Model of SLC4A1 and Transport Site Identification

- the human red cell anion exchanger AE1. *J. Physiol.* **581**, 33–50
13. Guizouarn, H., Gabillat, N., Motais, R., and Borgese, F. (2001) Multiple transport functions of a red blood cell anion exchanger, tAE1: its role in cell volume regulation. *J. Physiol.* **535**, 497–506
 14. Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fiévet, B., and Motais, R. (1996) A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 985–994
 15. Fiévet, B., Gabillat, N., Borgese, F., and Motais, R. (1995) Expression of band 3 anion exchanger induces chloride current and taurine transport: structure-function analysis. *EMBO J.* **14**, 5158–5169
 16. Fiévet, B., Perset, F., Gabillat, N., Guizouarn, H., Borgese, F., Ripoche, P., and Motais, R. (1998) Transport of uncharged organic solutes in *Xenopus* oocytes expressing red cell anion exchangers (AE1s). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10996–11001
 17. Jennings, M. L. (1976) Proton fluxes associated with erythrocyte membrane anion exchange. *J. Membr. Biol.* **28**, 187–205
 18. Jennings, M. L., and Smith, J. S. (1992) Anion-proton cotransport through the human red blood cell band 3 protein. Role of glutamate 681. *J. Biol. Chem.* **267**, 13964–13971
 19. Tang, X. B., Kovacs, M., Sterling, D., and Casey, J. R. (1999) Identification of residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 3557–3564
 20. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
 21. Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., and Mitsuoka, K. (2010) Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J. Struct. Biol.* **169**, 406–412
 22. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., and Lomize, A. L. (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40**, D370–D376
 23. Benkert, P., Künzli, M., and Schwede, T. (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* **37**, W510–W514
 24. Ray, A., Lindahl, E., and Wallner, B. (2012) Improved model quality assessment using ProQ2. *BMC Bioinformatics* **13**, 224
 25. Passow, H., Fasold, H., Gärtner, E. M., Legrum, B., Ruffing, W., and Zaki, L. (1980) Anion transport across the red blood cell membrane and the conformation of the protein in band 3. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **341**, 361–383
 26. Picollo, A., Malvezzi, M., Houtman, J. C., and Accardi, A. (2009) Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the CLC family of channels and transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1294–1301
 27. Lu, F., Li, S., Jiang, Y., Jiang, J., Fan, H., Lu, G., Deng, D., Dang, S., Zhang, X., Wang, J., and Yan, N. (2011) Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* **472**, 243–246
 28. Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) X-ray structure of a CLC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–294
 29. Krishnamurthy, H., Piscitelli, C. L., and Gouaux, E. (2009) Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**, 347–355
 30. Faham, S., Watanabe, A., Bessner, G. M., Cascio, D., Specht, A., Hirayama, B. A., Wright, E. M., and Abramson, J. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* **321**, 810–814
 31. Weyand, S., Shimamura, T., Yajima, S., Suzuki, S., Mirza, O., Krsung, K., Carpenter, E. P., Rutherford, N. G., Hadden, J. M., O'Reilly, J., Ma, P., Saidijam, M., Patching, S. G., Hope, R. J., Norbertczak, H. T., Roach, P. C., Iwata, S., Henderson, P. J., and Cameron, A. D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science* **322**, 709–713
 32. Abramson, J., and Wright, E. M. (2009) Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 425–432
 33. Zhu, Q., Lee, D. W., and Casey, J. R. (2003) Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1. *J. Biol. Chem.* **278**, 3112–3120
 34. Groves, J. D., and Tanner, M. J. (1999) Structural model for the organization of the transmembrane spans of the human red-cell anion exchanger (band 3; AE1). *Biochem. J.* **344**, 699–711
 35. Groves, J. D., and Tanner, M. J. (1999) Topology studies with biosynthetic fragments identify interacting transmembrane regions of the human red-cell anion exchanger (band 3; AE1). *Biochem. J.* **344**, 687–697
 36. Tang, X. B., Fujinaga, J., Kopito, R., and Casey, J. R. (1998) Topology of the region surrounding Glu⁶⁸¹ of human AE1 protein, the erythrocyte anion exchanger. *J. Biol. Chem.* **273**, 22545–22553
 37. Fujinaga, J., Tang, X. B., and Casey, J. R. (1999) Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1. *J. Biol. Chem.* **274**, 6626–6633
 38. Taylor, A. M., Zhu, Q., and Casey, J. R. (2001) Cysteine-directed cross-linking localizes regions of the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1) relative to the dimeric interface. *Biochem. J.* **359**, 661–668
 39. Popov, M., Tam, L. Y., Li, J., and Reithmeier, R. A. (1997) Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. *J. Biol. Chem.* **272**, 18325–18332
 40. Kanki, T., Sakaguchi, M., Kitamura, A., Sato, T., Mihara, K., and Hamasaki, N. (2002) The tenth membrane region of band 3 is initially exposed to the luminal side of the endoplasmic reticulum and then integrated into a partially folded band 3 intermediate. *Biochemistry* **41**, 13973–13981
 41. Kuma, H., Shinde, A. A., Howren, T. R., and Jennings, M. L. (2002) Topology of the anion exchange protein AE1: the controversial sidedness of lysine 743. *Biochemistry* **41**, 3380–3388
 42. Wainwright, S. D., Mawby, W. J., and Tanner, M. J. (1990) The membrane domain of the human erythrocyte anion transport protein. Epitope mapping of a monoclonal antibody defines the location of a cytoplasmic loop near the C-terminus of the protein. *Biochem. J.* **272**, 265–268
 43. Hirai, T., Hamasaki, N., Yamaguchi, T., and Ikeda, Y. (2011) Topology models of anion exchanger 1 that incorporate the anti-parallel V-shaped motifs found in the EM structure. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 148–156
 44. Paw, B. H., Davidson, A. J., Zhou, Y., Li, R., Pratt, S. J., Lee, C., Trede, N. S., Brownlie, A., Donovan, A., Liao, E. C., Ziai, J. M., Drejer, A. H., Guo, W., Kim, C. H., Gwynn, B., Peters, L. L., Chernova, M. N., Alper, S. L., Zapata, A., Wickramasinghe, S. N., Lee, M. J., Lux, S. E., Fritz, A., Postlethwait, J. H., and Zon, L. I. (2003) Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat. Genet.* **34**, 59–64
 45. Chu, C., Woods, N., Sawasdee, N., Guizouarn, H., Pellissier, B., Borgese, F., Yenchitsomanus, P. T., Gowrishankar, M., and Cordat, E. (2010) Band 3 Edmonton I, a novel mutant of the anion exchanger 1 causing spherocytosis and distal renal tubular acidosis. *Biochem. J.* **426**, 379–388
 46. Guizouarn, H., Borgese, F., Gabillat, N., Harrison, P., Goede, J. S., McMahon, C., Stewart, G. W., and Bruce, L. J. (2011) South-east Asian ovalocytosis and the cryohydrocytosis form of hereditary stomatocytosis show virtually indistinguishable cation permeability defects. *Br. J. Haematol.* **152**, 655–664
 47. Zaki, L., Böhm, R., and Merckel, M. (1996) Chemical labelling of arginyl-residues involved in anion transport mediated by human band 3 protein and some aspects of its location in the peptide chain. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 1053–1063
 48. Böhm, R., and Zaki, L. (1996) Towards the localization of the essential arginine residues in the band 3 protein of human red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1280**, 238–242
 49. Stewart, A. K., Kedar, P. S., Shmukler, B. E., Vandrope, D. H., Hsu, A., Glader, B., Rivera, A., Brugnara, C., and Alper, S. L. (2011) Functional characterization and modified rescue of novel AE1 mutation R730C associated with overhydrated cation leak stomatocytosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C1034–C1046

8 Résumés.

8.1 Résumé en anglais.

AE1 (SLC4A1, band 3) is a member of the SLC4 bicarbonate transporter family. This protein is the most abundant membrane protein on the surface of vertebrate red blood cells. The AE1 exchanges chloride and bicarbonate ions in physiological conditions. In red blood cells, it is essential to many tasks including CO₂ transport and cytoskeleton anchoring in the plasma membrane.

Point mutations in the membrane spanning domain of AE1 convert the electroneutral exchange into a conductance for sodium and potassium cations or induce a cation leak in a still functional anionic exchanger.

The molecular determinants that induce the movement of ions through the exchanger are still unknown. This work aims at identifying and mapping the transport site of AE1 protein in normal and pathological conditions.

We modified a sulfhydryl-based chemistry to AE1. This provided information on the role of amino acids in the transport site of the protein. This strategy combined with the development of a three-dimensional model of the protein *in silico*, based on the uracil/proton symporter, allowed us to define the transport site of AE1.

Analysis of our results showed that a single transport site in AE1 can switch between three different conformations depending on protein mutation:

- I classical chloride/bicarbonate exchange,
- II cation leak and anion exchange,
- III cation leak only.

According to our data the transport site involves the transmembrane segments 3, 5 and 8 and a highly conserved intracellular loop between transmembrane segments 8 and 9. The transport site is centered around the amino acids L468, F471, L530, L673, I533 and ends at glutamic acid 681. The intracellular loop 690-705 acts as a cation filter.

Our three-dimensional model will facilitate the study and identification of other key residues in the functioning of the wild type AE1 and its pathological mutants. In addition, it supports the analysis of AE1 membrane domain crystals.

Résumé

L'AE1 (SLC4A1, bande 3) est un membre de la famille des transporteurs de bicarbonate SLC4. Cette protéine est la protéine membranaire la plus abondante à la surface des globules rouges des vertébrés. L'AE1 effectue un échange chlorure/bicarbonate électroneutre dans des conditions physiologiques. Dans les globules rouges elle est essentielle à plusieurs tâches : notamment le transport du CO₂ et à l'ancrage du cytosquelette à la membrane plasmique.

Des mutations ponctuelles dans la partie membranaire de l'AE1, liées à des pathologies humaines, convertissent l'échange électroneutre en voie de conductance pour les cations sodium et potassium ou induisent une fuite de cations dans un échangeur d'anions toujours fonctionnel.

Les déterminants moléculaires qui induisent les mouvements d'ions au travers de cet échangeur sont encore inconnus. Le travail présenté a eu pour but d'identifier et de cartographier le site de transport de la protéine dans ses versions normale et pathologique.

Pour cela nous avons adapté à l'AE1 des outils basés sur la chimie des sulfhydryles capable de donner des informations sur le rôle d'acides aminés dans le site de transport de la protéine dans des conditions où la protéine effectue un échange chlorure/bicarbonate classique ou présente une fuite de cations. Cette stratégie combinée à l'élaboration d'un modèle tridimensionnel de la protéine *in silico* basé sur le symporteur uracile/proton nous a permis de définir le site de transport de l'AE1.

Nos résultats démontrent qu'un site de transport unique dans l'AE1 peut basculer entre 3 conformations différentes selon les mutations de la protéine :

- I échange chlorure/bicarbonate classique,
- II une fuite de cation et un échange anionique,
- III la fuite de cation uniquement.

Selon nos données, ce site met en jeu les segments transmembranaires 3, 5 et 8 ainsi qu'une boucle intracellulaire très conservée située entre les segments transmembranaires 8 et 9. Le site de transport se structure autour des acides aminés L468, F471, L530, I533 et L673 se terminant au niveau de l'acide glutamique 681 et de la boucle intracellulaire 690 à 705 agissant comme un filtre à cations.

Notre modèle tridimensionnel permettra de faciliter l'étude et l'identification d'autres résidus clés dans le fonctionnement de l'AE1 sauvage et de ses mutants pathologiques. De plus c'est un support pour l'analyse de cristaux du domaine membranaire de l'AE1.